

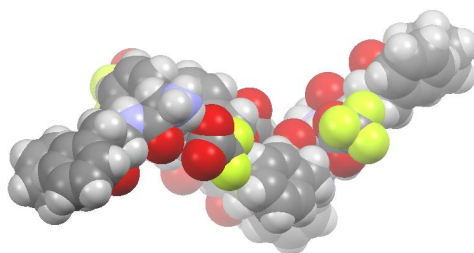


SELF-ASSEMBLY OF PHENYLALANINE DERIVATIVES

Polymers and Biopolymers

2017

Enric Mayans Tayadella



Advisors: Carlos Alemán Llansó

Jordi Puiggalí Bellalta

Carlos Cativiela Marín

Departament d'Enginyeria Química,
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona
Escola d'Enginyeria de Barcelona Est
Centre de Recerca en Nanoenginyeria,
Universitat Politècnica de Catalunya;
Institut de Síntesi Química i Catàlisi Homogènia



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Thesis submitted to obtain the degree of *Philosophiæ Doctor (Ph.D.)*
from Universitat Politècnica de Catalunya (UPC)

Carlos Alemán Llansó

Catedràtic d'universitat

Escola d'Enginyeria de Barcelona Est

Universitat Politècnica de Catalunya

Jordi Puiggalí Bellalta

Catedràtic d'universitat

Escola d'Enginyeria de Barcelona Est

Universitat Politècnica de Catalunya

Carlos Cativiela Marín

Catedràtic d'universitat

Institut de Síntesi Química i Catàlisi Homogènia

Universitat de Saragossa

Nubilis in verba

(Anonymous)

Abstract

Since the pioneering work of Reches and Gazit in 2003, in which the formation of diphenylalanine (FF) nanotubes in aqueous solution was discovered, significant efforts have been made to develop a new generation of biomaterials based on the self-assembly of aromatic peptides. From recent investigations, the self-assembly of phenylalanine homopeptides can be understood by a combination of hydrogen bonding and repeated aromatic stacking interactions.

In this Thesis, new phenylalanine homo-oligopeptide derivatives have been synthesized in order to test their self-assembly capability and to examine the influence of the chemical structure and the external conditions. Although, the terminal head-to-tail $\text{NH}_3^+ \cdots \text{OOC}^-$ interactions in the unprotected homopeptides are shown to stabilize the peptide assemblies, chemical modulation has been introduced through the incorporation of the *N*- and *C*-protections, such as aromatic blocking groups (Chapter 4 and 5.2), azide-alkyne coupling groups (Chapter 3.2) or trifluoroacetate anion (Chapter 3.1). In Chapter 4, three FFFF-based peptides have been synthesized to study the role of the head-to-tail $\text{NH}_3^+ \cdots \text{OOC}^-$ interactions in the assembly of FFFF-derivatives. Although these interactions are not possible upon the incorporation of the *N*-Fmoc and *C*-OBzl protections, defined hierarchical assemblies arising from π - π stacking interactions have been found.

In Chapter 6, new hybrid polypeptide/polylactide conjugates have been prepared through ring opening polymerizations to reveal the effect of the constitutive polylactide block. Whereas the crystallization from the melt gave rise to spherulites from lamellar arrangements, previously reported phenylalanine-oligopeptide hierarchical morphologies have been observed from diluted solutions.

We report that the homopeptide length also plays a significant role in the supramolecular organization of phenylalanine derivatives. First, in Chapter 5.2, theoretical calculations have indicated that the stability of Phe-homopeptides capped with two fluorenyl functionalities increases with the length of the Phe-segment, adopting an antiparallel β -sheet arrangement. While the existence of diverse polymorphs suggests that π - π stacking interactions involving fluorenyl groups result in different stable conformations, they are more versatile, in terms of molecular self-association, than hydrogen bonds. Besides, the capacity of FFF to assemble in very diverse supramolecular structures has been found to be greater than that exhibited by its homologues with an even number of Phe residues (Chapter 5.1). Additionally, spherulites from the prepared diblock copolymers with a distinctive lamellar disposition (i.e. flat-on or edge-on) and/or dendritic structures have been identified in function of the length of the PPhe block (Chapter 6).

Results have evidenced not only the remarkable control exerted by the characteristics of the environment (i.e. the solvents mixture, temperature, the ionic strength, and the peptide concentration) in the organization of the assemblies, but also by the substrate (Chapter 5.3). Depending on the conditions, molecules can organize into bundled arrays of nanotubes, stacked braids, corkscrew-like, doughnut/volcano-like, spherulitic microstructures and/or triaxial ellipsoid-like nodules. Peptide \cdots peptide interactions, peptide \cdots surface interactions and the surface roughness have been detected as key factors for the shape, dimensions and stability of the hierarchical assemblies. The proposed mechanisms for the formation of supramolecular structures

have reflected how the structural nucleation and hierarchical growing are controlled through the balance between peptide···peptide and peptide···solvent interactions, which in turn are regulated by the peptide concentration and the polarity of the solvent mixture used to dissolve the peptide, respectively.

Tuning the structure of Phe-derivatives by changing the medium used in the mixture, as well as the surface, is a very attractive feature to expand the potential utility of peptide assemblies in different fields, for example as molecular carriers and delivery systems. The wide range of available surfaces offers a valuable tool for the development of bionanotechnological applications based on hierarchical peptide assemblies. Indeed, the ability of plasma treated polystyrene for stabilizing well-defined dendritic structures has been found to be particularly noticeable.

Agraïments

Primerament agrair als meus directors l'haver-me donat l'oportunitat de realitzar la meua tesi doctoral en l'autoorganització en fase sòlida de biomolècules, un camp realment increïble, tot compartint opinions i il·lusions. Us estic agraït per donar-me les eines i instruments que m'han ajudat a elaborar-la amb èxit.

En les primeres pàgines d'aquest treball resa el lema *Nobilis in verba*, “veu per tu mateix”. Aquesta experiència m'ha permès descobrir i micrografiar aquest món meravellós, on la sinèrgia de petites forces i el seu ordre determinen la creació o destrucció d'estructures superiors, cada cop més jerarquitzades i complexes. Gràcies per haver-me donat l'ocasió de “veure” aquestes estructures mitjançant les diferents tècniques emprades.

D'altra banda, realment agraeixo a les persones que m'han acompanyat durant aquests anys no només l'ajuda i la guia en els meus primers passos d'aquest treball, sinó l'haver compartit coneixements, consells, convivència, triomfs i decepcions... però sobretot ciència. Al Francesc Estrany, pel seva inestimable dedicació amb els equips d'AFM. Les imatges dels volcans i apilaments no haguessin sigut possibles sense tu! A la M^a Teresa, pels meus primers moments amb el microscopi òptic, i per ensenyar-me a alinear les lents! A la Georgina Fabregat, per compartir les primeres experiències sobre l'autoorganització de pèptids, i també al Lucho, pel dia a dia durant aquests anys. Al Trifón, per les lliçons de ‘pilot’ de SEM, i sobretot, per ser al CrNE! A la Lourdes Campos, a qui dec, no només, les seves paraules d'ànim i motivació que m'han permès acabar aquesta tesi, sinó també pel seu *savoir-faire* que intentaré recordar per un futur.

No gens menys, voldria agrair als companys i professors del Departament d'Enginyeria Química tota la seva dedicació i experiència, la qual ha contribuït notablement en la confecció d'aquesta tesi. A la Mar i l'Elaine per ajudar-me en la síntesi dels conjugats. A la Angélica Díaz i la Yolanda Márquez, per donar-me coneixements de cristal·lització de polímers. A la Lourdes Franco, pel seu saber sobre DSC i TGA. A l'Abdel, per dedicar-me una bona part del seu temps! Sento haver-te donat tanta feina! A la Carmen, per haver compartit tants somriures com cigarrets! A l'equip de química computacional, pels cafès i dinars compartits. A l'Anna per compartir aquesta experiència d'iniciació a la recerca. Igualment voldria agrair a Javier Sendros i Andrea Gemma la seva dedicació i paciència, els quals encoratjo profundament en seguir en el camp bionanotecnològic.

Als meus companys de biologia per tots aquells dinars 13:45, sobretauls passats per cafè amb gel, entrepans d'embotits de la Cerdanya i vasets de ratafia. Ja sigui salvant el planeta, planejant

els pròxims viatges, donant canya a la ciència, o escrivint la versió nostrada del *cards against humanity*, lo que més us vull agrair és haver-ho pogut fer amb vosaltres!

A la meva família: no podria haver arribat fins aquí sense vosaltres, gràcies de tot cor pel vostre suport.

I finalment, a la Nora... per tot, per estar sempre present fent-me costat!

L'Hospitalet de Llobregat, Juliol 2017

Scientific publications

Scientific production derived from this Thesis:

1. Enric Mayans, Gema Ballano, Jordi Casanovas, Angélica Díaz, Maria M. Pérez-Madrigal, Francesc Estrany, Jordi Puiggalí, Carlos Cativiela, and Carlos Alemán. Self-Assembly of Tetraphenylalanine Peptides. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 16895–16905.
2. Enric Mayans, Gema Ballano, Jordi Casanovas, Luis J. del Valle, Maria M. Pérez-Madrigal, Francesc Estrany, Ana I. Jiménez, Jordi Puiggalí, Carlos Cativiela, and Carlos Alemán. Hierarchical self-assembly of di-, tri- and tetraphenylalanine peptides capped with two fluorenyl functionalities: from polymorphs to dendrites. *Soft Matter* **2016**, *12*, 5475-5488.
3. Enric Mayans, Georgina Fabregat, Ruben Juárez, Carlos Cativiela, Jordi Puiggalí, and Carlos Alemán, Surface Mediated Hierarchical Assemblies of Highly Hydrophobic Phenylalanine-Based Peptides, *Chemistry Select* **2017**, *2*, 1133–1139.
4. Enric Mayans, Jordi Casanovas, Ana M. Gil, Ana I. Jiménez, Carlos Cativiela, Jordi Puiggalí, and Carlos Alemán. Diversity and Hierarchy in Supramolecular Assemblies of Triphenylalanine: From Laminated Helical Ribbons to Toroids. *Langmuir* **2017**, *33*, 4036–4048.
5. Enric Mayans, Gema Ballano, Javier Sendros, Mercè Font-Bardia, J. Lourdes Campos, Jordi Puiggalí, Carlos Cativiela, and Carlos Alemán. Effect of the solvent choice in the self-assembly properties in a diphenylalanine amphiphile stabilized by an ion pair. *Chem. Phys. Chem.* **2017**, *18*, 1888-1896.
6. Andrea Gemma, Enric Mayans, Gema Ballano, Juan Torras, Angélica Díaz, Ana I. Jiménez, Jordi Puiggalí, Carlos Cativiela, and Carlos Alemán. Self-assembly of diphenylalanine with preclick components as capping groups. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, Accepted Manuscript. 10.1039/C7CP03792A.

Glossary of acronyms

^1H NMR	Proton NMR
^{13}C NMR	Carbon NMR
2D // 3D	Bidimensional / tridimensional
$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$	Rotation angle of the polarized light at 25 °C
AA	Aminoacid
Ac-	Acetyl
ACN	Acetonitrile
AcOH	Acetic acid
AFM	Atomic force microscopy
AMBER	Assisted model building with energy refinement
BEs	Binding energies
Boc-	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bs	Broad singlet (NMR)
BSSE	Basis set superposition error
c	Concentration
$\text{C}\equiv\text{C}$	Alkyne
CC-CC	Central chain-central chain interactions
CD	Circular dichroism
CH_3CN	Acetonitrile
CH_2Cl_2	Dichloromethane
CHCl_3	Chloroform
Ciclo-	Cyclic dipeptide derivative
$\text{C}=\text{O}$	Carbonyl
δ	Chemical shift
d	Doublet (NMR)
D (Asp)	Aspartic acid aminoacid
$d_{\text{H-O}}$	N-H \cdots O distance
$d_{\pi-\pi}$	The separation between the stacked rings
ΔE	Relative energy ($E_{\text{parallel}} - E_{\text{antiparallel}}$)
ΔE_{int}	Interaction energies
ΔE_{coop}	Cooperative energy (many-body non-additive effects)
$\Delta\Delta E_{\text{coop}}$	$\Delta E_{\text{coop}}(\text{antiparallel}) - \Delta E_{\text{coop}}(\text{parallel})$
DCM	Dichloromethane
dd	Doublet of doublets (NMR)

DFT	(Kohn–Sham) Density functional theory
DFT-D	DFT with a dispersion correction
DLA	Diffusion limited aggregation
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamine
DMAP	4-Dimethylaminopyridine
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethylsulfoxide
dq	Doublet of quartets (NMR)
dt	Doublet of triplets (NMR)
ϵ	Dielectric constant
EDC	1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide
ESI	Electrospray ionization
EtOH	Ethanol
Φ_{solvent}	Volume fraction of a solvent
F (L-Phe)	Phenylalanine aminoacid (* in F* means opposite chirality)
<i>FD</i>	Fractal dimension
FF	Diphenylalanine dipeptide
FFF	Triphenylalanine tripeptide
FFFF	Tetraphenylalanine tetrapeptide
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Fmoc-	<i>N</i> -(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)
FTIR	Fourier-Transform Infrared Spectroscopy
G (Gly)	Glycine aminoacid
$G' // G''$	Storage and loss moduli
GBSW	Generalized Born model with a simple switching function
GGA	Generalized gradient approximation
h	hour(s)
HCl	Hydrochloric acid
HRMS	High resolution mass spectrometry
HR-SEM	High resolution SEM
HFIP	Hexafluoro-isopropanol
HOBt	1-hydroxy-7-azabenzotriazole
θ, \angle	Angle
J	Nuclear coupling constant
K (Lys)	Lysine aminoacid
<i>K_a</i>	Acidity constant
K_{eq}	Thermodynamic equilibrium constant

KHSO ₄	Potassium bisulfate
λ	Wavelength
LC-LC	Lateral chain-lateral chain
M, <i>m</i>	Mass
m	Multiplet (NMR)
MeOH	Methanol
MeOD ₄	<i>d</i> ₄ -Methanol
MD	Molecular dynamics
MgSO ₄	Magnesium sulfate
m.p.	Melting point
MQ-grade	Milli-Q grade water
$\tilde{\nu}$	Wavenumber (cm ⁻¹)
NaHCO ₃	Sodium bicarbonate
N _{hbonds}	Number of hydrogen bonds
NH ₃ ⁺	Ammonium cation
N–H···O	Hydrogen bond (different variations)
NK point	<i>k</i> -point mesh
NMM	<i>N</i> -methylmorpholine
NMR	Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy
N ₃	Azide group
-OBzl	Benzyl ester
-OEt	Ethyl ester
-OFm	Fluorenyl-9-methyl ester
OM	Optical microscopy
⁻ OOC	Carboxylate anion
-OPrp	Propargiloxi group
OS	Organic solvent
O _w –H _w	Hydrogen bond (O _w and H _w refers to the O and H atoms of water)
π – π	Aromatic stacking interactions
PBC	Periodic boundary conditions
PEG	Polyethylene glycol
PEO	Poly(ethylene oxide)
<i>p</i> K	–log(<i>K</i>)
PLA	Poly(lactic acid)
Poc-	Propargyloxycarbonyl group
PPhe	Poly(L-Phe)

ⁱ PrOH	Isopropanol
qd	Quartet of doublets (NMR)
R (Arg)	Arginine
R _g	Radius of gyration
RMS	Root-mean-square
Rq	RMS roughness
RT	Room temperature
s	Singlet (NMR)
S (Ser)	Serine aminoacid
SANS	Small angle neutron scattering
SASA	Solvent accessible surface area
SEM	Scanning electron microscope
STRIDE	Structure identification algorithm
td	Triplet of doublets (NMR)
TEM	Transmission electron microscope
TFA	Trifluoroacetic acid
TFE	Trifluoroethanol
THF	Tetrahydrofuran
TOF	Time-of-flight
UV-Vis	Ultraviolet-visible
V	Volume
VMD	Visual molecular dynamics
WAXS	Wide angle X-ray scattering
XRD	X-ray diffraction
z	Charge
Z	Number of molecular components
ω, ψ, θ, φ	dihedral angles
≈	Similar to

Table of Contents – Taula de continguts

Abstract	iii
Agraïments	v
Scientific publications	vii
Glossary of acronyms	ix
I. Introducció general	1
1.1. Nanoestructures peptídiques autoorganitzades	3
1.2. Aplicacions i avantatges dels materials autoorganitzats basats en oligopèptids	4
1.3. Introducció a l'estructura i propietats d'oligopèptids de fenilalanina i conjugats de polímer sintètic	6
1.3.1. La difenilalanina, FF	6
1.3.2. Fmoc-FF	7
1.3.3. Homooligofenilalanines monodisperses i derivats	12
1.3.4. Polímers sintètics conjugats d'oligofenilalanina	19
1.4. Referències	20
II. Objectives	25
III. Self-assembly of new diphenylalanine amphiphiles	31
3.1. Effect of the solvent choice in the self-assembly properties in a diphenylalanine amphiphile stabilized by an ion pair	33
3.1.1. Introduction	35
3.1.2. Results and Discussion	37
3.1.3. Conclusions	51
3.1.4. Experimental Section	52
3.1.5. References	55
3.2. Self-assembly of diphenylalanine with preclick components as capping groups	57
3.2.1. Introduction	59
3.2.2. Results and Discussion	61
3.2.3. Conclusions	86
3.2.4. Experimental Section	87
3.2.5. References	90

IV. Self-assembly of tetraphenylalanine derivatives	95
4.1. Self-assembly of tetraphenylalanine peptides	97
4.1.1. Introduction	99
4.1.2. Results and Discussion	100
4.1.3. Conclusion	117
4.1.4. Experimental Section	118
4.1.5. References	122
V. Self-assembly of triphenylalanine derivatives	125
5.1. Diversity and hierarchy in supramolecular assemblies of triphenylalanine: from laminated helical ribbons to toroids	127
5.1.1. Introduction	129
5.1.2. Antecedents: FF, FFF and FFFF assemblies	130
5.1.3. Results and Discussion	131
5.1.4. Conclusions	152
5.1.5. Methods	153
5.1.6. References	156
5.2. Hierarchical self-assembly of di-, tri- and tetraphenylalanine peptides capped with two fluorenyl functionalities: from polymorphs to dendrites	159
5.2.1. Introduction	161
5.2.2. Results and Discussion	162
5.2.3. Conclusions	187
5.2.4. Methods	188
5.2.5. References	193
5.3. Surface mediated hierarchical assemblies of highly hydrophobic phenylalanine-based peptides	197
5.3.1. Introduction	199
5.3.2. Results and Discussion	200
5.3.3. Conclusions	215
5.3.4. Experimental Section	215
5.3.5. References	217

VI. Self-assembly of polylactide having phenylalanine blocks	219
6.1. Hybrid polypeptide/polylactide copolymers having short polyphenylalanine blocks	221
6.1.1. Introduction	223
6.1.2. Results and Discussion	225
6.1.3. Conclusions	243
6.1.4. Experimental Section	244
6.1.5. References	249
VII. Conclusions	253
Annex A: I. Introducción general	261
1.1. Nanoestructuras peptídicas autoorganizadas	263
1.2. Aplicaciones y ventajas de los materiales autoorganizados basados en oligopéptidos	264
1.3. Introducción a la estructura y propiedades de oligo-péptidos de fenilalanina y conjugados de polímero sintético	266
1.3.1. La difenilalanina, FF	266
1.3.2. Fmoc-FF	267
1.3.3. Homooligofenilalaninas monodispersas y derivados	272
1.3.4. Polímeros sintéticos conjugados de oligofenilalanina	279
1.4. Referencias	280

I. INTRODUCCIÓ GENERAL

1.1. Nanoestructures peptídiques autoorganitzades

La descoberta feta per Reches i Gazit, on es manifesta la formació immediata de nanotubs al precipitar una solució del dipèptid difenilalanina (FF, on F = L-Phe) amb un excés d'aigua,^[1] és un dels treballs pioners sobre l'autoorganització d'oligopèptids. Des de llavors, s'han dut a terme grans esforços per desenvolupar biomaterials basats en l'autoorganització de pèptids aromàtics, que ja es consideren una nova classe de materials deguts a la seva senzillesa estructural i versatilitat funcional, baix cost i multitud d'aplicacions.

L'autoorganització es defineix com un procés espontani en el qual les molècules s'agregen a través d'un procés de reconeixement molecular per formar estructures ordenades. El model clàssic de cristal·lització considera el creixement cristal·lí com un procés d'amplificació en què nuclis estables són simplement ampliat per la replicació de les cèl·lules unitat, sense incórrer en canvis estructurals en la superfície. Per contra, el creixement de cristalls per agregació de *building blocks* preformats és un procés de muntatge a mesoescala que resulta en cristalls únics amb textures de mosaic isoorientades. Aquest procés pot ocórrer a través de la coalescència de les nanopartícules primàries en agregats col·loïdals, sovint de mida uniforme, i la seva posterior reestructuració interna per produir una partícula cristal·logràficament contínua.

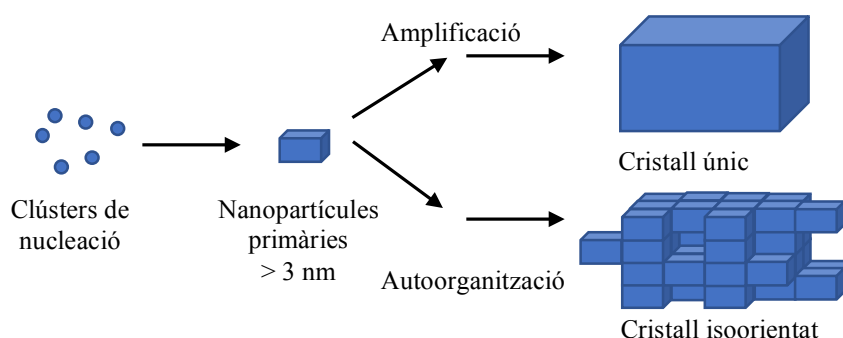


Figura 1. Mecanismes alternatius de creixement de cristalls únics.
Adaptat de la Ref. [2] amb l'autorització de Wiley.

Els mecanismes per a la formació d'estructures autoorganitzades, com són els nanotubs i nanoestructures, s'atribueixen a forces hidrofòbiques i d'apilament π entre els anells aromàtics en un medi líquid i polar com l'aigua. Durant aquesta tesi es considerarà l'entorn que envolta l'espècie en qüestió i s'estudiarà aquest medi a partir de les seves propietats físiques (constant dielèctrica, força iònica, rugositat) i químiques (interaccions aromàtiques, formació de ponts d'hidrogen, afinitat química, polaritat). Aquesta tesi intentarà il·lustrar les característiques d'autoorganització de materials basats en *building blocs* d'oligofenilalanina, així com avaluar el seu procés d'interacció amb una superfície, que pot presentar unes determinades propietats ben diferenciades del si de la solució.

1.2. Aplicacions i avantatges dels materials autoorganitzats basats en oligopèptids

Les estructures autoorganitzades, com els nanotubs i nanofibres de FF, i en general d'oligopèptids, són nanomaterials amb un gran ventall d'aplicacions potencials. Els materials estructurats en la nanoescala, com les proteïnes i pèptids, estan essent emprats com a *building blocks* en biomaterials,^[3] materials intel·ligents que ofereixen resposta a estímuls externs,^{[4],[5]} medicina regenerativa,^[6] administració de fàrmacs,^[7] teràpia gènica,^[5] o per a aplicacions nanotecnològiques.^[8] L'estructura i el procés d'autoorganització són temes d'alt impacte en la fabricació de materials supramoleculars, però la naturalesa biològica dels materials és la clau per a la biocompatibilitat. Els materials basats en proteïnes i oligopèptids poden ser utilitzats en la fabricació a gran escala d'embenatges, enginyers mèdics que permetin la lenta desorció de fàrmacs o altres materials biodegradables d'ús mèdic.^[9]

D'entre aquests, els pèptids aromàtics estan guanyant terreny en la fabricació *bottom-up* de nanomaterials. La geometria plana dels residus aromàtics i les restriccions degudes al seu apilament influencien l'autoorganització dels pèptids aromàtics amfífils. El disseny de les nanoestructures pot ser racionalitzat a partir dels apilaments moleculars aromàtics que pot adoptar i en la propensió de la cadena principal peptídica en formar làmines β . Així, en general, els possibles empaquetaments aromàtics que poden adoptar aquests pèptids són els apilaments paral·lels, antiparal·lels, i l'apilament intercalat antiparal·lel.^[10]

Estructuralment, les fibres compostes de *building blocks* basats en pèptids estructurats en làmines β o fragments β -amiloides ofereixen avantatges com poder controlar el nivell d'organització, tenen una resistència excepcional a condicions extremes (temperatura, agents desnaturalitzants, etc.) i ofereixen la possibilitat d'introduir canvis a nivell de seqüència per tal d'obtenir diferents funcionalitats. Així, els fragments β poden ser emprats en el disseny racional de nanoobjectes artificials i nanodispositius.^[11]

Paral·lelament, els nanocristalls tubulars de FF han estat extensament explorats en nanociència, ja que ofereixen unes propietats úniques: alta estabilitat mecànica i tèrmica, intrínseca piezo- i ferroelectricitat, i la possibilitat de modificar la seva morfologia a través de controlar les condicions externes, o mitjançant funcionalitzacions químiques.^[12] En la Taula 1, s'enumeren les aplicacions més rellevants que actualment s'han proposat per a les nanoestructures de FF.

Taula 1. Principals aplicacions de les nanoestructures.

Objecte	Camp d'estudi	Aplicació	Referència
Octapèptids (làmina β)		Canals d'ions transmembrana, agents citotòxics, administració de fàrmacs	[13], [14]
FF, pèptids	Biologia	Biològiques, biomaterials	[15]
FF	Biotecnologia, Biomedicina		[16], [17]
FF	"	Transport i administració de fàrmacs	[18–20]
Fmoc-FF	"	Cultius cel·lulars	[21–23]
Fmoc-FF i pèptids,	"	Medicina regenerativa, teràpies	[24]
Tripèptids de FF	"	Emulsificants	[25]
Derivats de FF i FFFF amb Gd	"	Agents de contrast en IRM	[26]
Derivats de FF	Nanotecnologia		[27]
FF, pèptids	"	Nanodispositius	[28], [29]
FF	Electroquímica	Biosensors	[30], [31]
FF	"	Transistors d'efecte de camp	[32]
FF i derivats FF	"	Fabricació de sensors ultrasensibles i selectius	[33]
FF	"	Detecció selectiva de neurotoxines	[34]
FF	"	Bateries i supercapacitadors	[35–37]
FF	"	Piezoelectrics i ferroelectrics	[38–41]
Derivats de FF, Ciclo-FF	Fotoelectrònica		[42]
Ciclo-FF	Fotoelectrònica		[43–45]
Derivats amiloides de FF	"	Cel·les solars	[46], [47]
FF	"	Cel·les solars	[48]
FF + porfirina	"	Fotosíntesis biomimètica	[49]
FF	Òptica		[50–52]
FF	"	Immobilització de punts quàntics	[53]
Boc-FF, Boc-FFF	Microfluidica	Impressió <i>jet</i>	[54], [55]
FF	Catàlisi	Catàlisi heterogènia amb Pd en condicions aquoses	[56]

Finalment, cal introduir les estructures basades en conjugats peptídics de copolímers de bloc, que formulen una nova categoria dins els pèptids amfífils.^[57] Modificar un pèptid amb un segment de polímer pot suposar introduir tot un ventall de propietats a l'hoste, que reté les característiques biològiques d'autoagregació. Les propietats dels conjugats de pèptid-polímer abasten des la bioactivitat del fragment peptídic (controlant la seqüència d'aminoàcids), a les propietats físiques que introdueix el bloc de polímer, incorporant, per exemple, comportaments de resposta a estímuls externs, una estabilitat tèrmica incrementada i un temps de vida mitja superior.^[58]

1.3. Introducció a l'estructura i propietats d'oligopèptids de fenilalanina i conjugats de polímer sintètic

1.3.1. La difenilalanina, FF

L'estructura cristal·lina de la FF ha estat aconseguida per Görbitz,^[59-61] que descriu la FF cristal·litzada en cadenes β paral·leles enllaçades cap-cua per ponts d'hidrogen, tot formant canals hidrofílics de 10 Å allotjats dins la matriu hidrofòbica dels residus aromàtics de fenilalanina (Figura 2).

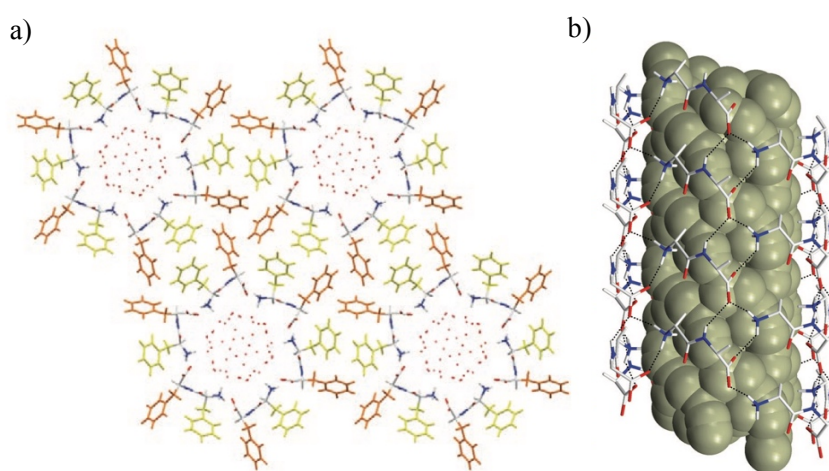


Figura 2. La cel·la unitària i l'empaquetament molecular de la FF vista des de l'eix cristal·logràfic c (a) Les esferes representen les molècules d'aigua. (b) Visió del canal hidrofílic de la FF representat per la superfície de van der Waals de les molècules d'aigua. Els residus aromàtics s'han omès per major claredat. Les línies puntejades representen els ponts d'hidrogen. Cal notar que cap enllaç C=O no accepta cap àtom d'hidrogen. Adaptat i reimprès de la Ref. [61] amb l'autorització de Wiley.

Els nanotubs de FF cristal·litzats en aigua estan formats per una xarxa de ponts d'hidrogen entre els dipèptids i les molècules d'aigua, que a la vegada sustenten els canals hidrofílics de la capa del nanotub. L'agregació d'hexàgons cara a cara i l'autoorganització als extrems produeix l'estructura jerarquitzada microtubular hexagonal final.^[62]

Des de fa temps, es coneix que el solvent afecta la conformació que adopten els pèptids.^[63] Recentment, s'ha observat que els nanotubs de FF cristal·litzats en aigua es dissolen en un ambient orgànic polar com el metanol, destruint la xarxa de ponts d'hidrogen.^[12] Aquest procés és reversible, de manera que en solució aquosa es pot refer aquesta xarxa i formar estructures hidratades com els nanotubs. El procés és rellevant i s'ha entès com un gran progrés en materials biològics.^[64]

A partir de solucions de MeOH saturades, s'han recollit monocristalls amb una estructura diferent a la de l'aigua. La nova estructura solvatomòrfica (FF-MeOH) té una cel·la unitat romboèdrica,

en lloc de l'hexagonal com la de l'aigua. A més, els enllaços peptídics queden amagats i s'exposen les cadenes laterals aromàtiques envers el solvent (Figura 3a). No obstant això, les dimensions de la cel·la unitària són similars i els enllaços peptídics també formen cadenes orientades paral·lelament a l'eix llarg del cristall, encara que aquí es disposen en *herringbone* (Figura 3b).^[12]

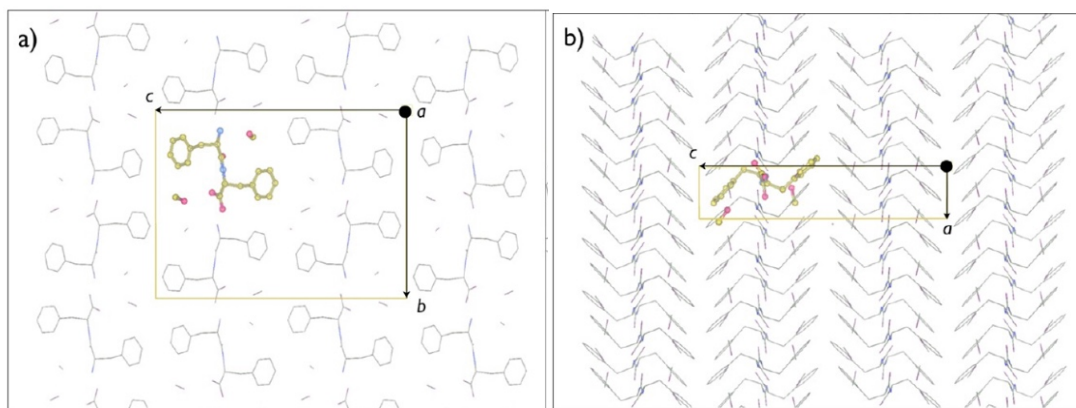


Figura 3. Cel·la unitària i empaquetament molecular de les estructures FF-MeOH vistes des de a) l'eix *a* i b) l'eix *b*. L'orientació de l'estructura FF-MeOH és tal que l'eix *a* s'alinea amb la dimensió més llarga de l'agulla cristal·lina. Adaptat i reimprès de la Ref. [12] amb l'autorització de The American Chemical Society.

La FF produeix altres estructures polimòrfiques emprant altres dissolvents en la preparació. Per exemple, s'han obtingut microcristalls amb EtOH (làmina β paral·lela), o organogels amb toluè^[65] (làmina β antiparal·lela) i *i*PrOH.^[66] Aquest dipèptid es mostra molt sensible a petites traces de solvents amb capacitat formadora de ponts d'hidrogen. Per exemple, s'obtenen microcristalls en CH₂Cl₂ pur, mentre que es forma un organogel fibrós si aquest conté petites quantitats d'algun solvent que estableix ponts d'hidrogen (EtOH, acetona o DMF).^[67]

A banda, les condicions d'evaporació, com la humitat relativa,^[68] i del medi aquós, com la força iònica o el pH,^[69] així com el substrat,^[70] afecten en gran mesura a la qualitat i la morfologia resultant. Aquest fet es fa palès degut a la gran quantitat de nanoestructures identificades^[71] i calculades.^[72]

1.3.2. Fmoc-FF

El derivat més estudiat del dipèptid difenilalanina és el derivat 9-fluorenilmetiloxicarbonil, Fmoc-FF. Mahler, Gazit i col·laboradors ja van descobrir que Fmoc-FF forma un hidrogel rígid ($G' = 20$ kPa) i òpticament transparent autoorganitzant-se en fibres de 10-100 nm de diàmetre en ser precipitat amb un excés d'aigua des d'una solució de HFIP concentrada (Figura 4A).^[73] La formació de fibres en lloc de nanotubs s'atribueix a l'empaquetament del grup Fmoc i a l'increment de les interaccions π - π durant l'autoorganització. Els autors assignen les bandes a

1607, 1658 i 1691 cm^{-1} en el FTIR a conformacions de làmina β i gir β . Els hidrogels de Fmoc-FF exhibeixen una baixa citotoxicitat i demostren ser un medi de suport per al creixement de cèl·lules d'ovari de hàmmster xinès.

Simultàniament (2006), Ulijn i col·laboradors presentaven uns estudis sobre els hidrogels de Fmoc-FF formats en acidificar amb HCl una solució bàsica del dipèptid (20 mM) fins a pH neutre. Els autors van investigar l'estructura molecular per mitjà de diferents tècniques. A partir de fluorescència, es va observar que es podia tractar d'una superposició de grups Fmoc apilats de forma antiparal·lela i addicionalment, l'aparició d'un pic a 1685 cm^{-1} en el FTIR és consistent amb un empaquetament antiparal·lel de les cadenes principals (Figura 4B1). A més, la senyal de CD és indicativa de les interaccions π - π dels grups fluorenil i la formació d'estructures super-helicoïdals.^[22]

En un dels seus estudis, els autors aprofundeixen indicant que els grups fluorenil són massa lluny per formar interaccions π - π en una làmina β antiparal·lela. Aquí es proposa un model basat en l'apilament escalonat dels pèptids i intercalant els grups fluorenil entre si. A més, degut a la torsió present en les pròpies làmines β , la segona làmina es rota en relació a la primera, de manera que els grups fluorenil interactuen al llarg de tota la seva longitud. Un total de 4 làmines β creen la secció d'un cilindre, on els fluorenils estan apilats en parelles entre els grups fenil a sobre i sota d'aquests, tot creant un agregat *J*. L'estructura general cilíndrica té una amplada de 30 Å, amb 28 monòmers per torn, i un forat al centre de 7 Å de diàmetre (Figura 4B). A partir de les imatges de TEM i WAXS, es va observar que les fibres estudiades es componen d'un empaquetament de dues fibril·les buides de 2.5-3 nm de diàmetre. La secció transversal de cada una de les fibril·les cilíndriques correspondria a quatre làmines β disposades a les arestes d'un quadrat i encarades en parells. Aquestes làmines β estarien estabilitzades per l'apilament π - π antiparal·lel dels grups Fmoc i les fibril·les s'unirien de costat donant lloc a les cintes planes que s'observen al TEM.^[74] Ulijn va observar que, en valorar la solució de Fmoc-FF a pH = 10.5 amb HCl, es produïen dues transicions àcides desplaçades a la d'un àcid dèbil ($pK_a \sim 10$ i ~ 6). Aquestes dues transicions semblen ser degudes a transformacions estructurals durant el procés d'autoorganització. S'observa que, per sota de l'aparent pK_{a1} , es formen les fibres compreses de làmines β antiparal·leles, que coincideix amb l'aparició de l'hidrogel dèbil ($G' = 10$ Pa). Per sota del pK_{a2} , les fibres s'agregarien lateralment, donant lloc a cintes més llargues ($d > 100$ nm) i produint-ne finalment la precipitació macroscòpica (Figura 4C).^[75]

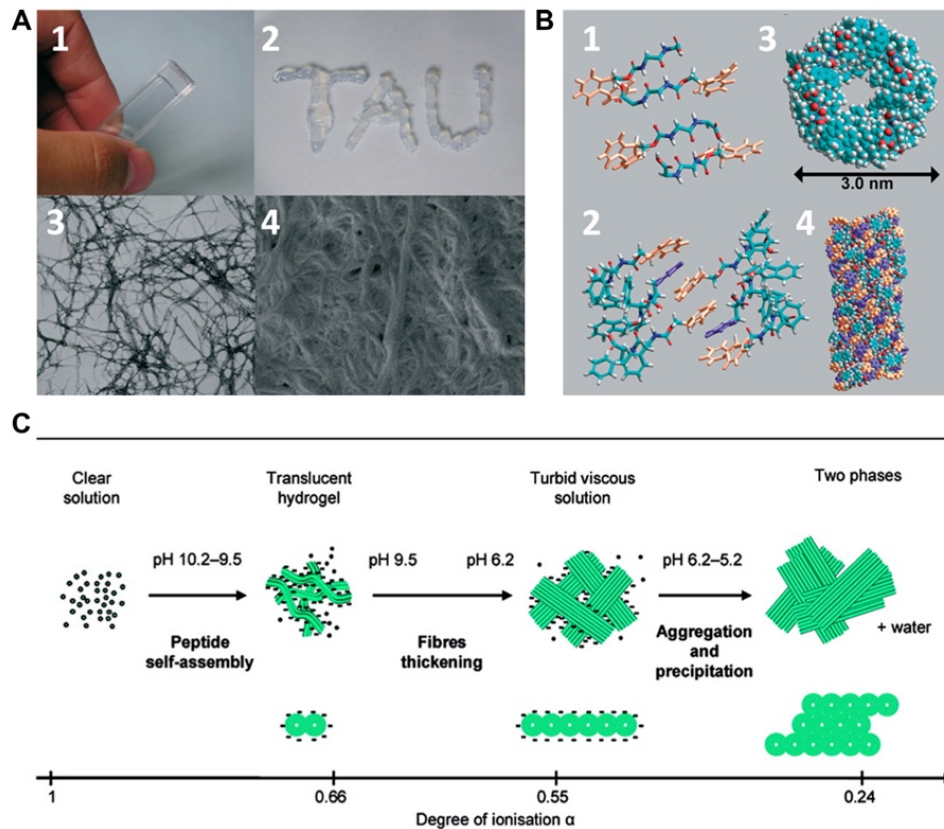


Figure 4. A) Imatges a escala macroscòpica i microscòpica del gel obtingut pel dipèptid Fmoc-FF. A1) Fmoc-FF s'organitza en un hidrogel autosuportat com es pot observar pel mètode de la cubeta invertida. A2) El gel es pot injectar a través d'una xeringa sense perdre l'estructura. A3) Imatges TEM revelen una xarxa fibrosa. A4) Imatge HR-SEM de la matriu gelatinosa. B) Model de mínima energia per a la disposició molecular de Fmoc-FF en l'estat gel emprant un camp de força AMBER. Els grups Fmoc es representen en taronja i els grups fenil en violeta. B1) Cadenes de Fmoc-FF disposades en un model de làmina β antiparal·lel. B2) Apilaments π formats al entreclavar parells de grups Fmoc tot alternant làmines β . B3) vista superior i B4) vista lateral de l'estructura cilíndrica formada per l'autoorganització de monòmers de Fmoc-FF. C) Mecanisme proposat per l'autoorganització de Fmoc-FF des de un pH alt a un pH baix, en funció del grau d'ionització. Reimprès de la Ref. [76] amb l'autorització de Elsevier.

En la literatura existeixen diferents mètodes per obtenir aquests gels, però els més estudiats són els produïts per un canvi de solvent (Mahler, Gazit) o un canvi de pH (Ulijn). No obstant això, tot i la gran variabilitat en les propietats mecàniques descrites, les característiques dels hidrogels de Fmoc-FF mostren ser fortament governades pel pH, deixant de banda el mètode emprat. Els gels amb G' més alta són els obtinguts amb el mètode de canvi de solvent. No obstant això, el pH final d'aquests tendeix a ser 4, la qual cosa els fa inservibles per a aplicacions biològiques. Es poden obtenir gels amb tampons salins a pH fisiològic, però les seves propietats varien notablement amb el tampó escollit en qüestió i essent el pH final el principal determinant de la rigidesa dels gels.^[77] Ja d'acord amb els resultats de Liebmann *et al.*,^[21] un segon factor rellevant és la proporció en volum de dissolvent del pèptid. Tal com es pot apreciar en aquests estudis, en incrementar la relació de DMSO:aigua, Φ_{DMSO} , de 0.05 a 0.25, G' augmenta fins a un màxim a 24kPa (pH 4).

L'habilitat d'un gel per recuperar-se després d'un esforç de cisalla (G'_{post}/G'_{pre}) s'associa a la percolació de les partícules de gel després de l'esforç i també és dependent de Φ_{DMSO} . Similar al comportament de G' , les fraccions baixes de Φ_{DMSO} (0.05-0.35) són les que es recuperen >80%. Imatges confocals a fraccions baixes Φ_{DMSO} mostren una microestructura esferulítica, especialment a 0.05, però que persisteix a més altes ($\Phi_{DMSO} = 0.5$), on el factor de recuperació ja és baix. Aquesta relació estructura/propietat ja ha estat identificada com un factor clau per a la obtenció d'hidrogels amb bones propietats de recuperació d'un esforç. La gran hidrofobicitat de Fmoc-FF resulta en nucleació i creixement (formació de dominis esferulítics) a un ampli rang de Φ_{DMSO} . En canvi, la microestructura dels gels obtinguts en una solució aquosa per canvi de pH és una xarxa uniforme de fibril·les fines, amb el conseqüent creixement de les fibres en gruix a pH més baix. De forma anàloga, pel dipèptid Fmoc-LG, la formació d'una xarxa uniforme s'identifica amb gels que no es recuperen després d'un esforç, d'acord amb un procés de descomposició espinodal, on, a partir d'un cert esforç, les unions es trenquen i no es recuperen.^[78]

Ja que Φ_{DMSO} i la microestructura són factors clau en les propietats del gel, Adams *et al* utilitzen diferents solvents per preparar els gels (DMSO, HFIP, Acetona i EtOH), observant que les propietats reològiques varien notablement amb la selecció del solvent. Els gels fets amb acetona són metaestables i precipiten en forma de cristallets útils per a XRD. Aquests cristalls mostren Fmoc-FF apilada de forma paral·lela en quatre piles al llarg de l'eix cristal·logràfic b , formant una estructura cristal·lina refinada com el grup quiral monoclínic C2 (Figura 5). Tot al contrari, els gels fets amb EtOH com a solvent orgànic semblen ser els més homogenis quant a distribució a microescala, presentant una xarxa uniforme de fibril·les entortolligades.

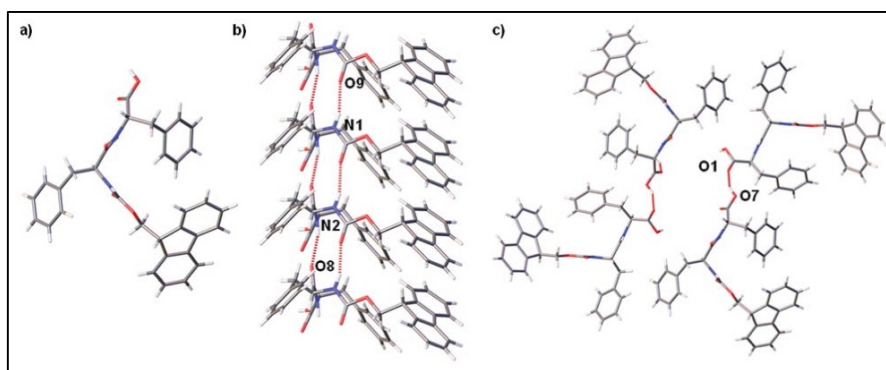


Figura 5. Estructura del cristall de Fmoc-FF·(H₂O)_{0.875}. A) Vista en perspectiva [010], B) mostrant quatre molècules de Fmoc-FF apilades al llarg de l'eix cristal·logràfic b associades a partir de ponts d'hidrogen. C) Empaquetament molecular cristal·lí de quatre apilaments paral·lels de molècules de Fmoc-FF centrats al voltant d'un eix de rotació de 180°, vista en perspectiva [010]. Les interaccions d'enllaç a hidrogen es mostren com línies puntejades, l'aigua de difusió s'ha omès per major claredat. Reimprès de la Ref. [79] amb l'autorització de The Royal Society of Chemistry.

Sorprenentment, les dimensions de les fibres obtingudes amb els diferents solvents són molt similars entre si en ser mesurades per SANS, però la morfologia de la xarxa de fibres resultant és controlada pel solvent emprat (Figura 6). Els gels fets amb EtOH a $\Phi_{\text{DMSO}} 0.3$ són els més forts, però tenen poca recuperació a l'esforç. En canvi, els gels amb DMSO o HFIP són forts, a més de recuperar-se un 95-100% en aturar l'esforç. Això s'atribueix a una microestructura on dominis de fibres en disposició esferulítica estan interconnectats per una fase fibrosa menys densa. En incidir un esforç, les unions es trenquen, però no els dominis. En aturar l'esforç, els dominis es poden reestructurar i formar una xarxa novament. A més, ja que moltes aplicacions són incompatibles amb un solvent orgànic, els autors mostren la possibilitat d'enretirar aquest solvent sense alterar les propietats de l'hidrogel.^[79]

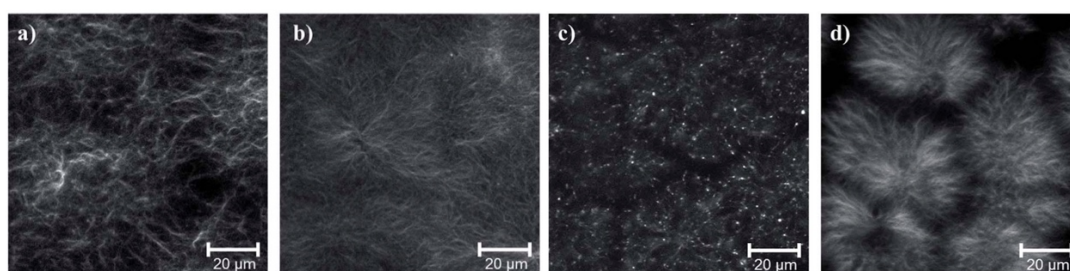


Figura 6. Imatges de microscòpia confocal 24 hores després de la preparació pels gels de Fmoc-FF a $\Phi_{\text{solvent}} = 0.3$ utilitzant a) DMSO b) EtOH c) Acetona d) HFIP. Els gels s'han tenyit amb Blau Nil. Adaptat i reimprès de la Ref. [79] amb l'autorització de The Royal Society of Chemistry.

En un article recent, Dudukovic i Zukoski observen la transició a gel en afegir aigua a una solució del dipèptid en DMSO.^[80] La solució passa ràpidament (<1 s) a un estat de no equilibri, donant lloc a esferes de ~ 2 μm que donen una consistència opaca, seguit de la formació de fibres de 5-10 nm (<5 min) que donen lloc al gel transparent. Aquestes fibres venen de la nucleació en un nombre limitat d'esferes i s'expandeixen cap al si de la solució, mentre que la resta d'esferes es veu atreta cap a les fibres i es dissolen tot expandint-ne la xarxa. Aquestes observacions indiquen que l'estructura fibrosa representa un mínim en l'energia lliure. A temps més llargs (>30 min), les fibres continuen evolucionant fins que tota la xarxa esdevé uniforme i estable per un temps infinit (anys). Aquesta reestructuració lenta ocorre mentre les molècules es redissolen i reordenen, estenent-se i creant noves ramificacions i unions entre els clústers fibrosos.

L'increment espontani de l'àrea superficial durant el procés de creixement i maduració és una evidència que, en augmentar les forces atractives, no resulta en una descomposició espinodal o cristal·lització. Com ha descrit Zaccarelli, la formació d'estructures elongades i uniformement distribuïdes es pot entendre com la formació d'estructures esteses, en equilibri, que relaxen lentament, compostes de partícules irregulars que experimenten un nombre baix d'interaccions o unions a baixes temperatures. La difusió lenta de les partícules entre les estructures ramificades

resulta en temps de relaxació llarg, típic dels gels. En els gels de Fmoc-FF fets pel mètode de canvi de pH (Ulijn), el dipèptid s'estructura en un model antiparal·lel de làmines β , creant una fibra de 3 nm. En aquest model, una molècula de Fmoc-FF tindria un nombre de coordinació 3: 1 per a la formació d'una làmina β + 2 per a l'apilament π - π del grup Fmoc amb una molècula a sobre i a sota.

A més, aquests gels són termorreversibles, tenen la capacitat de formar novament una xarxa dinàmica de fibres en refredar després de la fusió (>85 °C). Tot això s'interpreta, juntament amb les propietats mecàniques i de recuperació després d'un esforç de cisalla, com un gel col·loïdal en equilibri compost de partícules amb valència limitada, en lloc d'un gel on intervenen forces repulsives de llarg abast (apantallament electrostàtic).

1.3.3. Homooligofenilalanines monodisperses i derivats

La trifenilalanina, FFF

La recerca en el tripèptid FFF en el context d'aquesta tesi és escassa. Considerem que és de gran interès per ser el primer homòleg en la sèrie d'homooligofenilalanines. El primer estudi teòric realitzat amb una seqüència de tripèptid aromàtic data del 1989. S'hi estudien les preferències conformacionals i les interaccions locals del derivat *N*-acetil-*N*'-metilamida del tripèptid FFF.^[81] Els autors conclouen que la conformació estesa és la de més baixa energia i que les interaccions inter-residuals tenen poc efecte en la distància mitjana quadràtica cua-cua. Aquest estudi pretén recollir les primeres investigacions (1976-9) de C. Toniolo *et al* sobre l'estructura, tant en solució com en fase sòlida d'homooligofenilalanines ($n=2-7$) diprotegides, els quals, utilitzant les tècniques d'absorció en IR, DC i dispersió de Raman, ja exposen que els oligopèptids de fenilalanina adopten conformacions sense plegar en solució i estructures β en fase sòlida.

Més concretament, els primers estudis sobre el tripèptid H-FFF-OH desprotegit (2008-9) són els realitzats, precisament, per l'equip de G. Archontis i E. Gazit, P. Tamamis i L. Adler-Abramovich.^[82,83] En aquests, s'investiguen les característiques d'autoagregació de dues solucions aquoses de cadenes peptídiques, 12 FF o 8 FFF, amb els extrems ionitzats (OOC^- i NH_3^+), emprant simulacions en DM amb el model GBSW *replica-exchange* amb solvent implícit. En les dues solucions de pèptid, els monòmers freqüentment s'alineen amb altres, tot formant xarxes lineals estabilitzades per interaccions de pont d'hidrogen cap (NH_3^+) a cua (OOC^-) intermoleculars i del residu aromàtic. Els extrems d'aquestes cintes de pèptids sovint es toquen o són pròxims, formant els agregats el·lipsoïdals oberts o en forma d'anell (Figura 7).^[82]

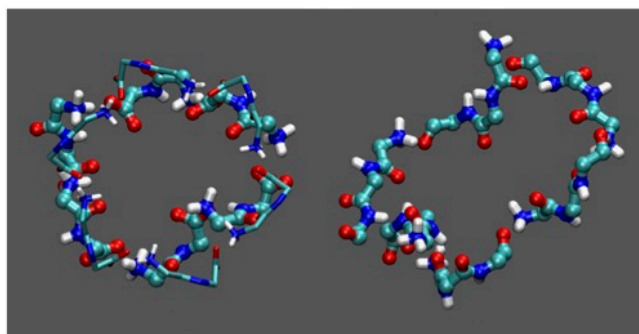


Figura 7. Representació de les xarxes en forma ‘d’anell’ formades per 6 pèptids de FF (esquerra) o FFF (dreta) en les simulacions a 300 K. Només els àtoms de la cadena principal de les xarxes es mostren en representació de boles. Els altres àtoms de la xarxa i l'agregat circumdant s'han omès. Per comparació, l'anell hexagonal dels cristalls de FF (en barres fines) també se superposa contra l'anell de simulació. Reimprès de la Ref. [83] amb l'autorització de The Biophysical Society.

Aquestes interaccions són més pronunciades en el tripèptid FFF que en FF, d'acord amb una major freqüència de formació de xarxes interpeptídiques i amb una major estabilitat dels agregats en el rang de temperatura estudiat (288–416 K), tot i que és capaç de difondre i reorganitzar-se.^[83] En segon terme, en analitzar el contingut d'estructura secundària en els agregats de FF o FFF amb un mòdul STRIDE de VMD, s'observa que el pèptid es pot organitzar per parelles, o, menys sovint, en tríos de cadenes –monòmers- en làmines β . Pràcticament el 100% de les làmines són antiparal·leles, amb excepció de les làmines de tríos de FFF, que són mixtes. En aquestes, l'orientació antiparal·lela no és la preferida termodinàmicament i, per exemple, el pèptid pot formar anells superposats al llarg del canal intern, com el cas dels cristalls de FF en paral·lel. En els cristalls de FF, el dipèptid té els dos residus aromàtics del mateix costat respecte l'enllaç peptídic. D'aquesta manera, els residus laterals s'encaren vers l'exterior dels anells en orientació “forma de T”. En el cas de FFF de les simulacions, els residus aromàtics són un 51% ‘forma de T’ i poden ser a l'interior de l'anell de l'agregat, sense interferir en les interaccions cap-a-cua (degut a la major llargada del pèptid). Aquesta diferència respecte la FF pot marcar un comportament excepcional en l'autoorganització en nanoestructures.

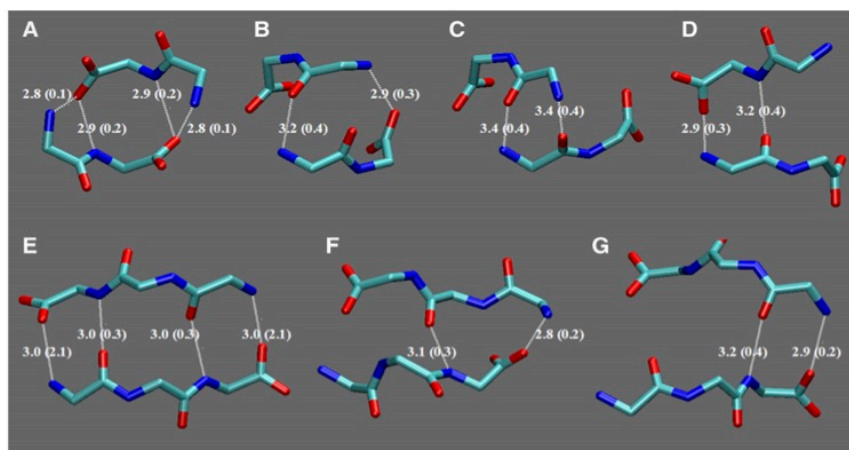


Figura 8. Patrons d'enllaços d'hidrogen més importants de les estructures en làmina β formades per dues cadenes de FF (part superior) i FFF (part inferior) en les simulacions a 300 K. Només els àtoms pesants de la cadena principal de les estructures es mostren en la representació. Es donen els valors de les distàncies mitjanes i de les desviacions estàndard (en entre parèntesis).—Potser la trec!!! Reimprès de la Ref. [83] amb l'autorització de The Biophysical Society.

Recentment, s'han realitzat càlculs amb el pèptid Ac-FFF-NH₂ amb DFT-D, que mostren que el pèptid es plega de manera que crea regions hidrofòbiques o microbutxaques en interaccionar amb els grups laterals aromàtics.^[84]

Per tal de revelar les diferències de comportament entre el mecanisme d'autoagregació de FF i FFF, s'han realitzat simulacions en MD “*coarse-grained*” amb un camp de força clàssic, duracions de 900-6000 ns a concentracions de 120, 80 i 45 mg/mL de FFF, i, anàlogament, amb FF.^[85] S'analitzen les trajectòries de les MD utilitzant diferents paràmetres: àrea superficial accessible al solvent (SASA), radi de gir R_g , radi de gir respecte l'eix X, Y i Z ($R_gX...$), l'energia lliure superficial 2D, la funció de distribució de les cadenes centrals de pèptid i la dels residus laterals i la distribució de probabilitat en mida de les làmines β .

A partir de múltiples simulacions des de l'estat desordenat inicialment, s'ha observat que els pèptids de FFF s'organitzen en nanoestructures sòlides, pràcticament plenes, i que poden ser nanoesfèriques o nanocilíndriques (22x10 nm) (Figura 9). El procés de formació de nanoestructures de FFF s'inicia amb la fusió de múltiples clústers (3 ns), que, al seu tron, es fonen en un agregat esfèric o allargat, respectivament (90-120 ns). La reorganització de les cadenes de pèptid en la direcció z acaba formant un agregat cilíndric allargat (180 ns), que és el pas anterior al nanocilindre estable (600 ns), o si, d'altra banda, aquesta reordenació és esfèrica, acaba donant una nanoesfera (600 ns). En ambdós casos, durant el procés de reordenació l'àrea accessible SASA es veu minimitzada i s'optimitzen les interaccions interpeptídiques.

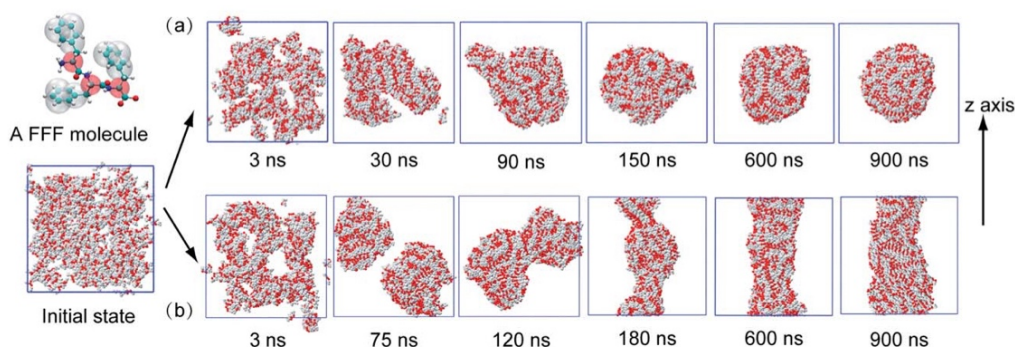


Figura 9. Trajectòries exemplars de 600 pèptids FFF (120 mg/mL) que donen lloc a la formació de nanoesferes (a) o nanocilindres (b), partint de l'estat desordenat. Les parts centrals es representen en vermell i les cadenes laterals en blanc. (A dalt, esquerra) Simplificació molecular del pèptid FFF utilitzada. Reimprès de la Ref. [85] amb l'autorització de The Royal Society of Chemistry.

Si es representa la superfície d'energia lliure en funció de la SASA i R_g per als dos sistemes de pèptids FFF i FF s'obté una forma angular (Figura 10). Això indica que en l'autoorganització dels pèptids, en primer lloc, la SASA en veu reduïda, reflectint les fortes interaccions hidrofòbiques i d'apilament aromàtic; seguit d'un lent procés de reordenació dels pèptids, especialment per a FFF. Per a FFF, s'obtenen dos mínims corresponents a les dues nanoestructures, però el procés d'autorganització no involucra la formació d'intermedis en bicapa (com el cas de la FF). Les cadenes principals de FFF afavoreixen un alineament en orientació antiparal·lela, podent formar grans estructures de làmines β (fins a 13 cadenes), ja que proporcionen més contactes de cadena lateral i interaccions electrostàtiques més fortes entre pèptids que FF. Val a dir que l'orientació antiparal·lela és estabilitzada per l'atracció electrostàtica entre els extrems carregats N- i C-terminals.

Contràriament a FFF, el sistema amb pèptids de FF presenta un comportament de tipus lípid i s'autorganitza en nanovesícules i tubs que retenen l'aigua. Les seves làmines β semblen aparèixer uniformement distribuïdes en les nanoestructures de FF. A més, aquestes són més petites i la seva població disminueix ràpidament amb la mida de la fulla β , essent un nombre típic 2-3 cadenes. Els autors observen que, a menor concentració de FFF (45 mg/mL), es formen nanoesferes, mentre que els nanocilindres només existeixen durant 2 μ s, convertint-se en una estructura esfèrica als 3500 ns. A alta concentració (120 mg/mL), s'observa que s'accelera la formació dels nanocilindres, però se'n manté el mecanisme.

L'anàlisi d'energia potencial de les interaccions de cadena central-cadena central (CC-CC) i cadena lateral-cadena lateral (LC-LC) i l'anàlisi de nombre de contacte revelen que l'autoorganització de FF i FFF és deguda a interaccions d'apilament aromàtic LC-LC, i que l'estructura final de FF i de FFF és el resultat de la competició entre interaccions de CC-CC polars i LC-LC aromàtiques.^[85]

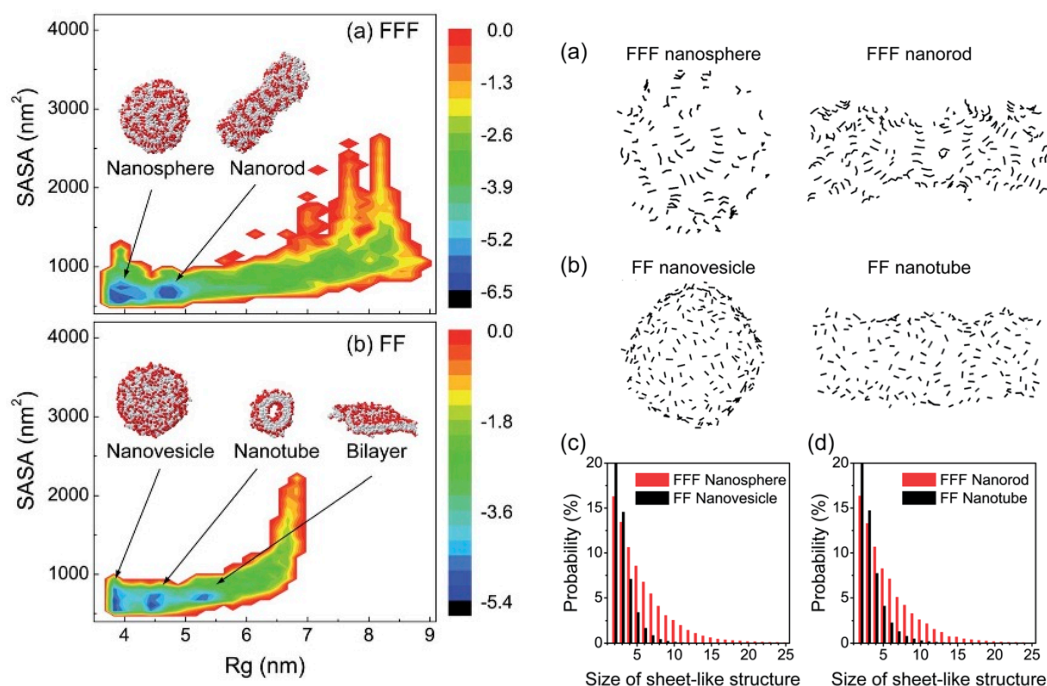


Figura 10. (Esquerra) Representació de l'horitzó d'energia lliure (kcal/mol) de (a) FFF i (b) FF projectat sobre el R_g i SASA. Representació de les conformacions de mínima energia dins els gràfics. (Dreta) Nanoestructures representatives de (a) FFF i (b) FF, i la seva respectiva distribució de probabilitat de làmina β en funció de la mida de la fulla. Per claredat s'han omès les cadenes laterals i les molècules d'aigua. Adaptat i reimprès de la Ref. [85] amb l'autorització de The Royal Society of Chemistry.

En un estudi més recent, Guo *et al*, obtenen nanoestructures toroïdals pel coempaquetament de FF i FFF (fracció de FFF 0.17-0.33), utilitzant aquesta mateixa metodologia teòrica, en solucions aquoses al 4 % en HFIP a una concentració total 4 mg/mL.^[86]

El derivat Fmoc-FFF

El tripèptid protegit Fmoc-FFF també ha estat estudiat, aquest cop, però, la primera aproximació a la estructura i a l'autoorganització és en forma de mètode enzimàtic per a l'obtenció de gels.^[87] En general, s'esperaria el desplaçament de l'equilibri cap a baixes concentracions de Fmoc-FFF ($K_{eq,1} < 1$) en mesclar la termolisina de *Thermoproteolyticus rokko*, Fmoc-FF i F en un medi aquós. No obstant això, l'autoorganització exerceix de força conductora en formar l'hidrogel del tripèptid, provocant el desplaçament de l'equilibri envers la hidròlisi inversa ($K_{eq,2} > K_{eq,1}$). El tripèptid resultant és produït amb un 55 % d'eficiència i forma fibril·les d'uns 10–20 nm de diàmetre (12mM), que donen lloc a un hidrogel autosuportat transparent, primer cop, a condicions fisiològiques (pH 7).^[88]

Estenent aquesta metodologia, Ulijn *et al* exploren les arquitectures funcionals de sèries d'homooligopèptids (glicina, leucina, fenilalanina, treonina) amb el grup Fmoc a través de les

reaccions enzimàtiques reversibles governades per la pròpia autoorganització. Partint dels aminoàcids protegits i dipèptids (o altrament metilèsters), es fan reaccionar amb termolisina per a obtenir hidrogels compostos de material ordenat en agregats- J i suportats per làmines β antiparal·leles. Aquest sistema combina tres característiques principals: i) es mostra reversible termodinàmicament, permetent la correcció estructural de defectes; ii) quimioselectivitat i amplificació de les estructures més estables en llibreries combinatòries dinàmiques; iii) el confinament espaciotemporal en la nucleació i el creixement.

Així, l'autoorganització assistida per enzims garanteix un control extra, especialment en les primeres etapes, en la fabricació *bottom-up* de nanomaterials, amb els quals es crearan noves estructures funcionals complexes. La reversibilitat i selectivitat de les reaccions enzimàtiques permetrà la directa autoorganització de pèptids a través de l'horitzó d'energia lliure i el descobriment de noves estructures nanoconfinades, que són clau en la formació d'estructures dinàmiques en els sistemes biològics.^[89]

Aquesta mateixa metodologia s'aplica per obtenir hidrogels de Fmoc-FFF (1.36 mg/mL), emprant dos tipus de lipases, més econòmiques que la termolisina, que permeten la incorporació tridimensional de cèl·lules i medi a través de la matriu no citotòxica.^[90]

No és fins el 2014 que s'estudien les propietats d'agregació del compost Fmoc-FFF pur, juntament amb el tripèptid homoquiral Fmoc-D-FFF (Fmoc-F*F*F*) i els heteroquirals DLL i LDD (Fmoc-F*FF i Fmoc-FF*F*, respectivament). Ja que les formes enantiomèriques D són menys propenses a la degradació enzimàtica, s'estudien aquests pèptids per millorar la seva estabilitat *in vivo*. La seva morfologia és rellevant, ja que aquests quatre tripèptids presenten un entramat de nanofibres de 7-10 nm de gruix (altura AFM) amb una estructura supramolecular en hèlice (Figura 11). Fmoc-FFF i FF*F* presenten una hèlice dextrògira i els altres dos levogira. Fmoc-FFF és el que presenta un pas de rosca més petit (17 nm), mentre que F*F*F*, el més gran (40 nm); els altres dos entre 23-28 nm. Aquests pèptids s'haurien d'empaquetar en una estructura tipus làmina β . Els autors no utilitzen FTIR per estudiar aquests pèptids, però sí el CD, conclouent que l'espectre conté característiques tant de làmina β com d'hèlix α . La molècula té dos tipus de grups aromàtics, la qual cosa augmenta la complexitat de l'espectre. Una peculiaritat és que en l'espectre dels pèptids DLL i LDD hi ha un pic inusualment intens a 260 nm, que és símptoma d'una forta agregació. A més, l'efecte de la dilució en l'absorbància és negligible, confirmant la presència d'agregats en solució. Finalment, l'hidrogel més rígid és l'homoquiral Fmoc-F*F*F*, cosa que permet concloure que la quiralitat juga un paper important en la formació d'una determinada estructura i modula les propietats fisicoquímiques dels gels.^[91]

Aquest mateix any s'estudia el comportament fàsic d'una sèrie de pèptids, Fmoc-FF i Fmoc-FFF entre ells. S'observen emulsions estables d'aigua-en-CHCl₃ en afegir Fmoc-FFF i emulsions CHCl₃-en-aigua estabilitzades per Fmoc-FF (Figura 12).^[92]

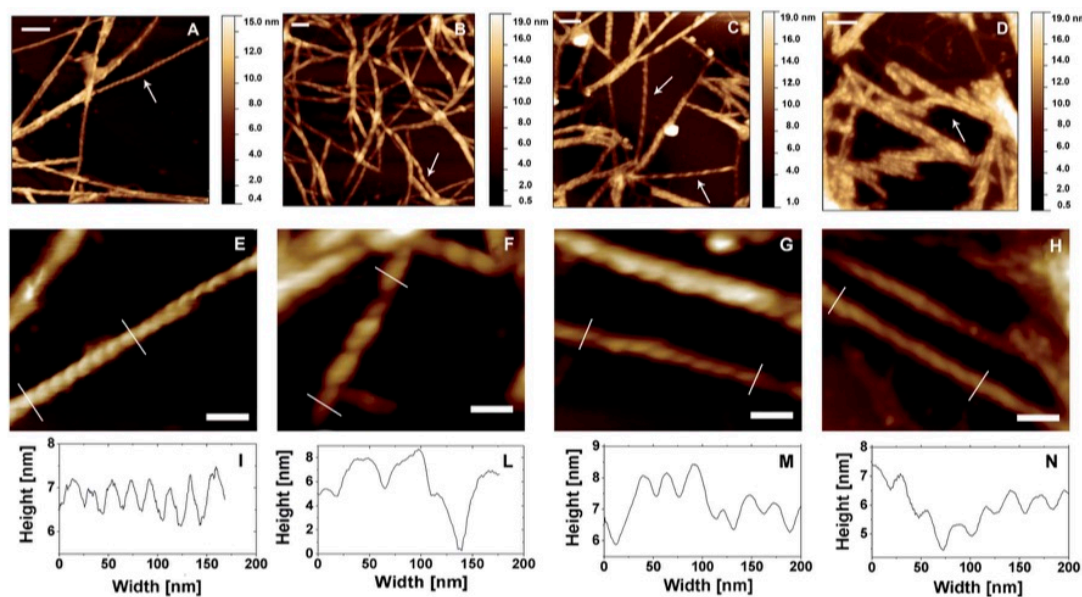


Figura 11. (A–D) Imatges d'altura de AFM de mostres de (A) Fmoc-FFF, (B) Fmoc-F*F*F*, (C) Fmoc-FF*F* i (D) Fmoc-F*F. Les fletxes indiquen fibres on la torsió és clarament visible. Barres d'escala $\frac{1}{4}$ 100 nm. (E–H) Imatges d'altura de AFM de nanofibres torçades de (E i I) Fmoc-FFF, (F i L) Fmoc-F*F*F*, (G i M) Fmoc-FF*F*, i (H i N) Fmoc-F*FF. Les línies perpendiculars a la fibra marquen el segment d'on es determina la secció longitudinal en els panells inferiors corresponents. Barres $\frac{1}{4}$ 50 nm. Reimprès de la Ref. [91] amb l'autorització de The Royal Society of Chemistry.

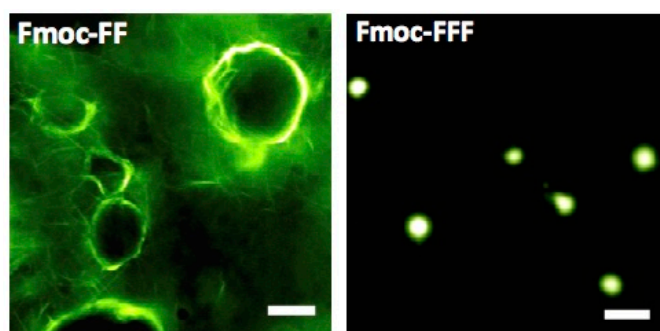


Figura 12. Gotes d'emulsió estabilitzades per Fmoc-FF i Fmoc-FFF contenint el cromòfor FITC en la fase aquosa. Les barres d'escala són 50 μm . Adaptat i reimprès de la Ref. [92] amb l'autorització de l'American Chemical Society.

La tetrafenilalanina i homooligofenilalanines monodisperses

El tetrapèptid FFFF desprotegit mai ha estat estudiat amb anterioritat a aquesta tesi, encara que sèries d'homooligofenilalanines monodisperses d'estructura $^t\text{Boc-Phe}_n\text{-OMe}$ ($n=2-7$) han estat àmpliament estudiades per C. Toniolo *et al* i els seus estudis ja han estat revisats.^[81] El tetrapèptid $^t\text{Boc-FFFF-OMe}$ i els oligòmers superiors en fase sòlida presenten una banda d'absorció en IR a 1644 (superiors 1641) cm^{-1} , i una espatlla a 1690 cm^{-1} , que és una mica superior a l'esperada per a una làmina β . No es tracta d'una hèlice α , ja que fins i tot els heptàmers tenen una llargada de

cadena inferior a la d'una hèlice en l'estat sòlid. Cal mencionar l'efecte del pes molecular en la conformació. Així com els oligòmers de L-Leu, L-Phe presenten làmines β , els seus homopolímers existeixen com a hèlices α dextrògires tant en l'estat sòlid com en alguns solvents. L'espatlla a 1690 cm^{-1} denota una orientació antiparal·lela de les cadenes, no obstant això, ja que el grup ^tBoc pot absorbir a 1690 cm^{-1} , se'n decideix enregistrar l'espectre de $\text{HCl}\cdot\text{H-Phe}_7\text{-OMe}$, mostrant una sola banda a 1639 cm^{-1} . Els autors conclouen que l'estructura secundària de l'últim es tracta d'un empaquetament inusual de làmines β paral·leles, atribuint aquest efecte a la presència del catió amoni. Pel cas dels oligopèptids protegits ($^t\text{Boc-Phe}_5\text{-OMe}$), es conclou a partir de l'UV-DC de films de pèptid, que presenten una estructura β paral·lela possiblement afavorida per interaccions de cadena lateral. El punt de creuament per l'heptàmer és similar a l'heptàmer de valina, 193 nm . Si, pel contrari, fos una estructura antiparal·lela, el punt de creuament seria a 178 nm , com en el cas del heptàmer de alanina. Els pèptids estudiats (Phe, Leu, Cha) presenten una gran propensió a formar agregats rics en estructura β en etilenglicol i solucions aquoses, podent ser destruïts per l'addició de TFE o HFIP.

1.3.4. Polímers sintètics conjugats d'oligofenilalanina

Els oligopèptids de fenilalanina (solament FFFF) també han estat funcionalitzats amb un fragment de polímer sintètic i igualment s'han descrit com a materials autoorganitzats i intel·ligents. En aquesta línia, els resultats de Castelletto i Hamley, per una banda, i Tzokova *et al*, per l'altra, presenten diferents conjugats de tetrafenilalanina enllaçada a un fragment de PEG (diferents pesos) que mostren un gran ventall de formes d'autoorganització i de propietats. Com mostren els resultats dels primers,^[93] les dues parts moleculars, el segment peptídic de FFFF i el bloc de copolímer de PEG_{100} tendeixen a organitzar-se en dominis independents, tal i com es pot explicar a nivell microscòpic per simulacions en MD atomístiques.^[94] A altes concentracions en solució s'observen làmines β antiparal·leles ben desenvolupades i el PEG es pot cristal·litzar sense irrompre en la làmina β local que defineix el segment peptídic durant el procés d'assecatge.

Paral·lelament, en les investigacions de Tzokova *et al* utilitzen *click-chemistry* per preparar conjugats de FFFF-OEt amb cadenes de 7, 26 i 39 unitats de PEO. La llargada del fragment de polímer juga un paper crucial en les propietats d'autoorganització.^[95] Per els blocs més curts ($\text{PEO}_7\text{-FFFF-OEt}$), es formen nanotubs en una estructura de làmina β antiparal·lela envoltada de cadenes de PEO, o bé hidrogels tous a altes concentracions.^[96] En incrementar la llargada del copolímer hidrofílic es dona lloc a fibres i en últim cas micel·les en forma de cuc, on l'apilament π - π preval sobre la formació de làmines β .

En vista de èxit d'aquests materials nanoestructurats, el grup IMEM ha simulat les característiques d'agregació del conjugat H-FFFF-PEG₁₀₀.^[94] En aquest treball es realitza una dinàmica molecular de 20 ns a un nivell de teoria B3LYP/6-31G(d) que mostra el desplegament del segment polimèric des de la forma de cabdell estadístic i es tracen els mapes de Ramachandran per a la rotació dels enllaços dels residus centrals de fenilalanina (Phe 2 i 3) en el bloc de FFFF.

Finalment, cal recordar que en treballs precedents en el grup PSEP s'han considerat i revisat les tècniques de síntesi de conjugats pèptid-polímer sintètic i els empaquetaments supramoleculars que poden adoptar, que es troben majoritàriament determinats pel fragment peptídic.^[97] El grup també ha publicat un estudi on es mostren les propietats estructurals de conjugats pèptid-polilàctide, en aquest cas: fenilalanina-PLA (F-PLA) i difenilalanina-PLA (FF-PLA). En aquest treball, el fragment peptídic del nou material basat en FF-PLA reté les preferències conformacionals natives del dipèptid FF que són necessàries per promoure la formació de nanoestructures a partir de l'autoagregació.^[98] Recentment, s'ha publicat la síntesi i les característiques físiques del copolímer de PLA i polifenilalanina (PPhe), on es mostra que el material se separa en fases cristal·lines de PLA i PPhe, com es mostra emprant tècniques de DSC, UV-Vis, raigs-X en pols (XRD) i microscòpia òptica de polarització.^[99]

1.4. Referències

- [1] M. Reches, E. Gazit, *Science* **2003**, *300*, 625–627.
- [2] H. Cölfen, S. Mann, *Angew. Chemie, Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 2350–2365.
- [3] S. Zhang, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1171–1178.
- [4] R. J. Mart, R. D. Osborne, M. M. Stevens, R. V. Ulijn, *Soft Matter* **2006**, *2*, 822–835.
- [5] P. Sharma, B. Rath, J. Rodrigues, N. Gorobets, *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *15*, 1268–1289.
- [6] H. Hosseinkhani, P.-D. Hong, D.-S. Yu, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4837–4861.
- [7] Q. Wang, X. Zhang, J. Zheng, D. Liu, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 25461–25469.
- [8] K. Rajagopal, J. P. Schneider, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 480–486.
- [9] E. Gazit, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1263–1269.
- [10] S. Fleming, R. V Ulijn, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 8150–8177.
- [11] B. A. Mittraki, K. Papanikolopoulou, M. J. V. A. N. Raaij, *Adv. Protein Chem.* **2006**, *73*, 97–124.
- [12] T. O. Mason, D. Y. Chirgadze, A. Levin, L. Adler-Abramovich, E. Gazit, T. P. J. Knowles, A. K. Buell, *ACS Nano* **2014**, *8*, 1243–1253.
- [13] M. R. Ghadiri, J. R. Granja, L. K. Buehler, *Nature* **1994**, *369*, 301–304.
- [14] L. Echegoyen, *Nature* **1994**, *369*, 276–277.
- [15] A. B. Seabra, N. Durán, *Peptides* **2013**, *39*, 47–54.
- [16] S. Marchesan, A. V. Vargiu, K. E. Styan, *Molecules* **2015**, 19775–19788.
- [17] X. Yan, P. Zhu, J. Li, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1877–1890.
- [18] R. Silva, D. Araujo, E. Silva, R. Ando, W. Alves, *Langmuir* **2013**, *29*, 10205–10212.

-
- [19] V. L. Sedman, L. Adler-Abramovich, S. Allen, E. Gazit, S. J. B. Tendler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6903–6908.
- [20] R. Huang, W. Qi, L. Feng, R. Su, Z. He, *Soft Matter* **2011**, *7*, 6222–6230.
- [21] T. Liebmann, S. Rydholm, V. Akpe, H. Brismar, *BMC Biotechnol.* **2007**, *7*, 88.
- [22] V. Jayawarna, M. Ali, T. A. Jowitt, A. F. Miller, A. Saiani, J. E. Gough, R. V. Ulijn, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 611–614.
- [23] V. Jayawarna, S. M. Richardson, A. R. Hirst, N. W. Hodson, A. Saiani, J. E. Gough, R. V. Ulijn, *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 934–943.
- [24] J. B. Matson, S. I. Stupp, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 26–33.
- [25] G. G. Scott, P. J. McKnight, T. Tuttle, R. V. Ulijn, *Adv. Mater.* **2016**, *28*, 1381–1386.
- [26] C. Diaferia, E. Gianolio, P. Palladino, F. Arena, C. Boffa, G. Morelli, A. Accardo, *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25*, 7003–7016.
- [27] M. Reches, E. Gazit, *Phys. Biol.* **2006**, *3*, S10–S19.
- [28] G. Rosenman, P. Beker, I. Koren, M. Yevnin, B. Bank-Srour, E. Mishina, S. Semin, *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 75–87.
- [29] A. Lakshmanan, S. Zhang, C. A. Hauser, *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 155–165.
- [30] M. Yemini, M. Reches, J. Rishpon, E. Gazit, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 183–186.
- [31] T. C. Cipriano, P. M. Takahashi, D. de Lima, V. X. Oliveira, J. A. Souza, H. Martinho, W. A. Alves, *J. Mater. Sci.* **2010**, *45*, 5101–5108.
- [32] T. Cipriano, G. Knotts, A. Laudari, R. C. Bianchi, W. A. Alves, S. Guha, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 21408–21415.
- [33] L. Adler-Abramovich, M. Badihi-Mossberg, E. Gazit, J. Rishpon, *Small* **2010**, *6*, 825–831.
- [34] J. H. Kim, J. Ryu, C. B. Park, *Small* **2011**, *7*, 718–722.
- [35] J. Ryu, S.-W. Kim, K. Kang, C. B. Park, *Adv. Mat.* **2010**, *22*, 5537–5541.
- [36] P. Beker, I. Koren, N. Amdursky, E. Gazit, G. Rosenman, *J. Mater. Sci.* **2010**, *45*, 6374–6378.
- [37] J. Ryu, S.-W. Kim, K. Kang, C. B. Park, *ACS Nano* **2010**, *4*, 159–164.
- [38] A. Kholkin, N. Amdursky, I. Bdikin, E. Gazit, G. Rosenman, *ACS Nano* **2010**, *4*, 610–614.
- [39] N. Amdursky, P. Beker, J. Schklovsky, E. Gazit, G. Rosenman, *Ferroelectrics* **2010**, *399*, 107–117.
- [40] I. Bdikin, V. Bystrov, S. Kopyl, R. P. G. Lopes, I. Delgadillo, J. Gracio, E. Mishina, A. Sigov, A. L. Kholkin, *Appl. Phys. Lett.* **2012**, *100*, 43702.
- [41] Z. Gan, X. Wu, X. Zhu, J. Shen, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 2109–2113.
- [42] C. Chen, K. Liu, J. Li, X. Yan, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *225*, 177–193.
- [43] J. S. Lee, I. Yoon, J. Kim, H. Ihee, B. Kim, C. B. Park, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 1164–1167.
- [44] A. Handelman, N. Kuritz, A. Natan, G. Rosenman, *Langmuir* **2016**, *32*, 2847–2862.
- [45] S. Semin, A. van Etteger, L. Cattaneo, N. Amdursky, L. Kulyuk, S. Lavrov, A. Sigov, E. Mishina, G. Rosenman, T. Rasing, *Small* **2015**, *11*, 1156–1160.
- [46] Y. Liang, P. Guo, S. V. Pingali, S. Pabit, P. Thiyagarajan, K. M. Berland, D. G. Lynn, *Chem. Commun.* **2008**, 6522–6524.

-
- [47] H. Acar, R. Garifullin, L. E. Aygun, A. K. Okayay, M. O. Guler, *J. Mater. Chem. A* **2013**, *1*, 10979–10984.
- [48] T. H. Han, H.-S. Moon, J. O. Hwang, S. Il Seok, S. H. Im, S. O. Kim, *Nanotechnology* **2010**, *21*, 185601–185607.
- [49] J. H. Kim, M. Lee, J. S. Lee, C. B. Park, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 517–520.
- [50] X. Yan, J. Li, H. Möhwald, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 2796–2801.
- [51] Q. Li, Y. Jia, L. Dai, Y. Yang, J. Li, *ACS Nano* **2015**, *9*, 2689–2695.
- [52] A. Handelman, A. Natan, G. Rosenman, *J. Pept. Sci.* **2014**, *20*, 487–493.
- [53] X. Yan, Y. Cui, Q. He, K. Wang, J. Li, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 1522–1526.
- [54] L. Adler-abramovich, E. Gazit, *J. Pept. Sci.* **2008**, 217–223.
- [55] J. Castillo-León, R. Rodriguez-Trujillo, S. Gauthier, A. C. Ø. Jensen, W. E. Svendsen, *Microelectron. Eng.* **2011**, *88*, 1685–1688.
- [56] M. A. Khalily, O. Ustahuseyin, R. Garifullin, R. Genc, M. O. Guler, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11358–11360.
- [57] S. Cavalli, F. Albericio, A. Kros, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 241–263.
- [58] D. J. Adams, P. D. Topham, *Soft Matter* **2010**, *6*, 3707–3721.
- [59] C. H. Görbitz, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 5153–5159.
- [60] C. H. Görbitz, *Chem. Commun.* **2006**, 2332–2334.
- [61] C. H. Görbitz, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 1022–1031.
- [62] M. Wang, L. Du, X. Wu, S. Xiong, P. K. Chu, *ACS Nano* **2011**, *5*, 4448–4454.
- [63] V. Madison, K. D. Kopple, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 420–427.
- [64] C. A. . E. . Hauser, S. Zhang, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *468*, 516–517.
- [65] P. Zhu, X. Yan, Y. Su, Y. Yang, J. Li, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 3176–3183.
- [66] R. Huang, Y. Wang, W. Qi, R. Su, Z. He, *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, *9*, 653.
- [67] J. Wang, K. Liu, L. Yan, A. Wang, S. Bai, X. Yan, *ACS Nano* **2016**, *10*, 2138–2143.
- [68] J. Kim, T. H. Han, Y.-I. Kim, J. S. Park, J. Choi, D. G. Churchill, S. O. Kim, H. Ihee, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 583–587.
- [69] P. Kumaraswamy, R. Lakshmanan, S. Sethuraman, U. M. Krishnan, *Soft Matter* **2017**, *13*, 886–886.
- [70] R. Huang, W. Qi, R. Su, J. Zhao, Z. He, *Soft Matter* **2011**, *7*, 6418–6421.
- [71] M. Hashemi, P. Fojan, L. Gurevich, *J. Self-Assembly Mol. Electron.* **2013**, *1*, 195–208.
- [72] C. Guo, Y. Luo, R. Zhou, G. Wei, *ACS Nano* **2012**, *6*, 3907–3918.
- [73] A. Mahler, M. Reches, M. Rechter, S. Cohen, E. Gazit, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1365–1370.
- [74] A. M. Smith, R. J. Williams, C. Tang, P. Coppo, R. F. Collins, M. L. Turner, A. Saiani, R. V. Ulijn, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 37–41.
- [75] C. Tang, A. M. Smith, R. F. Collins, R. V. Ulijn, A. Saiani, *Langmuir* **2009**, *25*, 9447–9453.
- [76] G. Fichman, E. Gazit, *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 1671–1682.
- [77] J. Raeburn, G. Pont, L. Chen, Y. Cesbron, R. Lévy, D. J. Adams, *Soft Matter* **2012**, *8*, 1168–1174.
- [78] J. Raeburn, A. Zamith Cardoso, D. J. Adams, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5143–5156.
- [79] J. Raeburn, C. Mendoza-Cuenca, B. N. Cattoz, M. A. Little, A. E. Terry, A. Zamith Cardoso, P. C.

- Griffiths, D. J. Adams, *Soft Matter* **2015**, *11*, 927–935.
- [80] N. A. Dudukovic, C. F. Zukoski, *Soft Matter* **2014**, *10*, 7849–7856.
- [81] Masahito Oka, Yoshihiro Baba, Akihiro Kagemoto, Akio Nakajima, *Polym. J.* **1989**, *21*, 1011–1017.
- [82] P. Tamamis, L. Adler-Abramovich, E. Gazit, G. Archontis, in *From Computational Biophysics to Systems Biology 2008 (CBSB08)* (Eds.: U. H. E. Hansmann, J. H. Meinke, S. Mohanty, W. Nadler, O. Zimmermann), John von Neumann Institute for Computing (Jülich), NIC Series, Vol. 40, pp. 393–396.
- [83] P. Tamamis, L. Adler-Abramovich, M. Reches, K. Marshall, P. Sikorski, L. Serpell, E. Gazit, G. Archontis, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 5020–5029.
- [84] E. Gloaguen, Y. Loquais, J. A. Thomas, D. W. Pratt, M. Mons, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 4945–4955.
- [85] C. Guo, Y. Luo, R. Zhou, G. Wei, *Nanoscale* **2014**, *6*, 2800–2811.
- [86] C. Guo, Z. A. Arnon, R. Qi, Q. Zhang, L. Adler-Abramovich, E. Gazit, G. Wei, *ACS Nano* **2016**, *10*, 8316–8324.
- [87] S. Toledano, R. J. Williams, V. Jayawarna, R. V. Ulijn, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1070–1071.
- [88] D. M. Ryan, B. L. Nilsson, *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 18–33.
- [89] R. J. Williams, A. M. Smith, R. Collins, N. Hodson, A. K. Das, R. V Ulijn, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 19–24.
- [90] L. Chronopoulou, S. Lorenzoni, G. Masci, M. Dentini, A. R. Togna, G. Togna, F. Bordini, C. Palocci, *Soft Matter* **2010**, *6*, 2525–2532.
- [91] L. Chronopoulou, S. Sennato, F. Bordini, D. Giannella, A. Di Nitto, A. Barbetta, M. Dentini, R. Togna, G. I. Togna, C. Palocci, *Soft Matter* **2014**, *10*, 1944–1952.
- [92] S. Bai, C. Pappas, S. Debnath, P. W. J. M. Frederix, J. Leckie, S. Fleming, R. V Ulijn, *ACS Nano* **2014**, *8*, 7005–7013.
- [93] V. Castelletto, I. W. Hamley, *Biophys. Chem.* **2009**, *141*, 169–174.
- [94] D. Zanuy, I. Hamley, C. Alemán, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 8937–8946.
- [95] N. Tzokova, C. M. Fernyhough, M. F. Butler, S. P. Armes, A. J. Ryan, P. D. Topham, D. J. Adams, *Langmuir* **2009**, *25*, 11082–11089.
- [96] N. Tzokova, C. M. Fernyhough, P. D. Topham, N. Sandon, D. J. Adams, M. F. Butler, S. P. Armes, A. J. Ryan, *Langmuir* **2009**, *25*, 2479–2485.
- [97] M. Morell, J. Puiggalí, *Polymers (Basel)*. **2013**, *5*, 188–224.
- [98] S. K. Murase, N. Haspel, L. J. del Valle, E. A. Perpète, C. Michaux, R. Nussinov, J. Puiggalí, C. Alemán, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 23231–23241.
- [99] M. Planellas, J. Puiggalí, *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 13247–13266.

II. OBJECTIVES

Objectives

Considering the composition of the peptides studied in this Thesis, the results have been organized in four different Chapters.

Chapter III, entitled “*Self-assembly of new diphenylalanine amphiphiles*” is focused on the self-assembly properties of three FF-derivatives with different characteristics. In section 3.1., a new FF-based amphiphile blocked at the C-terminus with a benzyl ester and stabilized at the N-terminus with a trifluoroacetate (TFA) anion, has been synthesized and characterized. Accordingly, in this peptide, hereafter named TFA·FF-OBzl, aromatic interactions are expected to be weaker than on other well studied peptides, as for example Fmoc-FF, while the dominant role played by intermolecular electrostatic interactions in FF is expected to decrease considerably because of the stability provided by the TFA. In section 3.2, the influence of the strength of intermolecular π - π stacking interactions in the self-assembly and supramolecular organization of FF-derivatives is analyzed. For this purpose, two capped peptides with much less capacity to interact through π - π stacking than Fmoc have been engineered and synthesized. Specifically, the azide and alkyne, which are typically used in click-chemistry reactions (*i.e.* azide-alkyne cycloaddition) for the synthesis of molecules with different architectures and functional groups, were chosen as terminal protecting groups. In the first peptide, hereafter denoted Poc-FF-N₃, the N-terminus was protected with the propargyloxycarbonyl group [Poc: –C(=O)–O–CH₂–C≡CH] while the C-terminus was blocked with the azidoethyloxi moiety (–O–CH₂–CH₂–N₃). In the second peptide, denoted N₃-FF-OPrp, the positions of alkyne and azide groups were exchanged.

The specific objectives of Chapter III, which is focused on the self-assembly capabilities of such three FF-derivatives, are:

- 1) To investigate the influence of the polarity of the medium, the peptide concentration and the ionic strength in the self-assembly of TFA·FF-OBzl.
- 2) To crystallize the TFA·FF-OBzl, comparing its structure with that reported for FF.
- 3) On the basis of the results achieved from objectives 1) and 2), to propose a mechanism of aggregation able to explain the supramolecular structures that are expected to be observed for this unique amphiphile.
- 4) To examine the influence of the strength of intermolecular π - π stacking interactions in the self-assembly and supramolecular organization of FF-derivatives. For this purpose, the Poc-FF-N₃ and N₃-FF-OPrp assemblies have been characterized by optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM), results being compared with those reported for Fmoc-FF-OFm, Fmoc-FF and FF.
- 5) To ascertain details about the interactions between Poc-FF-N₃ and N₃-FF-OPrp peptide molecules in their corresponding assemblies by complementing the structural analyses mentioned in 4) with both spectroscopic studies and theoretical calculations.

Chapter IV, entitled “*Self-Assembly of Tetraphenylalanine Derivatives*”, is devoted to study the self-assembly of tetraphenylalanine (FFFF)-derivatives, which display a higher, but still even, number of Phe residues than FF-derivatives. Thus, although the latter compounds have potential applications in the biomedical and biotechnological field, the self-assembly of FFFF-based peptides remains unstudied. In this Chapter, we have synthesized and studied three FFFF-based peptides to explore the formation of ordered self-assembled nanostructures: FFFF, Fmoc-FFFF and Fmoc-FFFF-OBzl, where OBzl refers to the benzyl ester group. The specific objectives of Chapter 4 are:

- 1) To synthesize FFFF, Fmoc-FFFF and Fmoc-FFFF-OBzl and study their self-assembly using SEM and atomic force microscopy (AFM).
- 2) To analyze the influence of the environment and the peptide concentration in the self-assembly of the three FFFF-derivatives.

- 3) Considering that unprotected FFFF is able to form head-to-tail $\text{NH}_3^+ \cdots ^-\text{OOC}$ interactions, which are not possible upon the incorporation of the *N*-Fmoc and C-OBzl protections, to propose tentative mechanisms for the formation of the observed self-assembled structures.

Chapter V, which has been titled “Self-assembly of triphenylalanine derivatives” presents the assembly properties of FFF and its derivatives. In the first part of this Chapter, we examine the assembly of uncapped FFF, which despite its simplicity has been scarcely studied. After this, the free basic (N-terminus) and acidic (C-terminus) ends of FFF have capped with Fmoc and 9-fluorenylmethyl ester (OFm) groups, respectively. The self-assembly capabilities of the resulting highly aromatic peptide, hereafter denoted Fmoc-FFF-OFm, have been examined and compared with those of its lower and higher homologues (Fmoc-FF-OFm and Fmoc-FFFF-OFm, respectively). Finally, we study the influence of the substrate in supramolecular assemblies formed by the highly aromatic Fmoc-FFF-OFm peptide. The specific objectives of Chapter 6 are:

- 1) To consider a homopeptide with an odd number of phenylalanine residues to complement previous investigations on FF and FFFF.
- 2) To ascertain if the preferences towards tube-like morphology observed for uncapped FF and FFFF, can be regulated for FFF by controlling the molecular self-assembly and/or the hierarchical supramolecular organization through the polarity of the incubation medium.
- 3) To compare the self-assembly capabilities of homopeptides with 2, 3 and 4 Phe residues and capped with Fmoc and OFm at the N- and C-terminus, respectively.
- 4) To examine the influence of the temperature, the peptide concentration and the polarity of the medium in self-assembly of Fmoc-FF-OFm, Fmoc-FFF-OFm and Fmoc-FFFF-OFm.
- 5) To compare the structures formed by Fmoc-FFF-OFm onto different silanized glass, scratched glass, stainless steel AISI 316, exfoliated mica, silicon wafer and carbon

coating from evaporation, polytetrafluoroethylene, plasma-functionalized polystyrene and nitrocellulose films surfaces.

- 6) To rationalize the impact of the surface on the hierarchical self-assembly of Fmoc-FFF-OFm through the most relevant surface characteristics: degree of hydrophilicity / hydrophobicity and the roughness / flatness.

Chapter VI is focused to the study of new hybrid polypeptide/polylactide conjugates and specifically those having polyphenylalanine blocks of different length. These hybrid materials offer a possibility to combine the specific properties of biomacromolecules and synthetic polymers in a single compound. The specific objectives of Chapter VI are:

- 1) To evaluate the capability to prepare diblock structures by the ring opening polymerization of lactide using a macroinitiator derived from phenylalanine.
- 2) To study the melt crystallization of polypeptide/polylactide conjugates in function of the length of the two constitutive blocks.
- 3) To study the crystallization behavior from dilute solutions of polypeptide/polylactide conjugates.
- 4) To evaluate the self-assembling capability of polypeptide/polylactide conjugates to determine the different crystalline morphologies that could be attained in function of the length of the constitutive blocks.

III. SELF-ASSEMBLY OF NEW DIPHENYLALANINE AMPHIPHILES

3.1. Effect of the solvent choice in the self-assembly properties in a diphenylalanine amphiphile stabilized by an ion pair

Abstract: A diphenylalanine amphiphile blocked at the C-terminus with a benzyl ester and stabilized at the N-terminus with a trifluoroacetate (TFA) anion has been synthesized and characterized. The aggregation of peptide molecules has been studied considering a peptide solution in an organic solvent and adding pure water, a KCl solution or another organic solvent as co-solvent. The choice of the organic solvent and co-solvent, and the solvent:co-solvent ratio allows tuning the mixture by modulating the polarity, the ionic strength and the peptide concentration. Differences in the properties of the media used to dissolve the peptides result in the formation of different self-assembled microstructures (e.g. fibers, branched-like structures, plates and spherulites). Furthermore, crystals of TFA·FF-OBzl have been obtained for X-ray diffraction from aqueous peptide solutions. Results reveal a hydrophilic core constituted by carboxylate (from TFA), ester and amide groups, which is surrounded by a hydrophobic crown with ten aromatic rings. This segregated organization explains the assemblies observed in different solvent mixtures as a function of the environmental polarity, ionic strength and peptide concentration.

Chapter section published as article: Enric Mayans, Gema Ballano, Javier Sendros, Merçè Font-Bardia, J. Lourdes Campos, Jordi Puiggalí, Carlos Cativiela, and Carlos Alemán. Effect of the solvent choice in the self-assembly properties in a diphenylalanine amphiphile stabilized by an ion pair. *Chem. Phys. Chem*, in press (2017). DOI: 10.1002/cphc.201700180.

Attention;

For copyright reasons, pages 33 to 56 of the thesis, containing the text mentioned here by, should be consulted at the editor's web
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphc.201700180/abstract>

3.2. Self-assembly of diphenylalanine with preclick components as capping groups

Abstract: Alkyne and azide, which are commonly used in the cycloaddition reaction recognized as “*click chemistry*”, have been used as capping groups of two engineered diphenylalanine (FF) derivatives due to their capacity to form weak intermolecular interactions (*i.e.* dipole- π and π - π stacking). In Poc-FF-N₃ the alkyne and azide act as N- and C-terminal capping groups, respectively, while such positions are exchanged in N₃-FF-OPrp. The self-assembly of such two synthesized peptides have been extensively studied in their “*pre-click*” state, considering the influence of three different factors: the peptide concentration, the polarity of the medium, and the nature of the substrate. Poc-FF-N₃ assembles into microfibers that, depending on the medium and the substrate, can aggregate hierarchically in supramolecular structures with different morphologies. The most distinctive one corresponds to very stable birefringent dendritic-like microstructures, which are derived from the ordered agglomeration of microfibers. These branched supramolecular structures, which are observed in a variety of conditions, are relatively uncommon in short FF sequences. At the molecular level, Poc-FF-N₃ organizes in antiparallel β -sheets stabilized by N-H \cdots O intermolecular hydrogen bonds and re-enforced by weak interactions between the azide and alkyne groups of neighbouring molecules. In opposition, N₃-FF-OPrp exhibits a very poor tendency to organize into structures with well-defined morphology. Theoretical calculations on model complexes indicate that the tendency of the latter peptide to organize into small amorphous agglomerates is due to its poor ability to form specific intermolecular interactions in comparison with Poc-FF-N₃. The implications of the weak interactions induced by the alkyne and azide groups, which reinforce peptide \cdots peptide hydrogen bonds and π -ladders due to the stacked aromatic phenyl side groups, are discussed.

Chapter section published as article: Andrea Gemma, Enric Mayans, Gema Ballano, Juan Torras, Angélica Díaz, Ana I. Jiménez, Jordi Puiggalí, Carlos Cativiela, and Carlos Alemán. Self-assembly of diphenylalanine with preclick components as capping groups. Under peer review.

Attention;

For copyright reasons, pages 58 to 94 of the thesis, containing the text mentioned here by, should be consulted at the editor's web <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/cp/c7cp03792a#!divAbstract>

IV. SELF-ASSEMBLY OF TETRAPHENYLALANINE DERIVATIVES

4.1. Self-assembly of tetraphenylalanine peptides

Abstract: Three different tetraphenylalanine (FFFF) based peptides that differ at the N- and C-termini have been synthesized by using standard procedures to study their ability to form different nanoassemblies under a variety of conditions. The FFFF peptide assembles into nanotubes that show more structural imperfections at the surface than those formed by the diphenylalanine (FF) peptide under the same conditions. Periodic DFT calculations (M06L functional) were used to propose a model that consists of three FFFF molecules defining a ring through head-to-tail $\text{NH}_3^+ \cdots ^-\text{OOC}$ interactions, which in turn stack to produce deformed channels with internal diameters between 12 and 16 Å. Depending on the experimental conditions used for the peptide incubation, N-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) protected FFFF self-assembles into a variety of polymorphs: ultra-thin nanoplates, fibrils, and star-like submicrometric aggregates. DFT calculations indicate that Fmoc-FFFF prefers a parallel rather than an antiparallel β -sheet assembly. Finally, coexisting multiple assemblies (up to three) were observed for Fmoc-FFFF-OBzl (OBzl = benzyl ester), which incorporates aromatic protecting groups at the two peptide terminals. This unusual and noticeable feature is attributed to the fact that the assemblies obtained by combining the Fmoc and OBzl groups contained in the peptide are isoenergetic.

Chapter section published as article: Enric Mayans, Gema Ballano, Jordi Casanovas, Angélica Díaz, Maria M. Pérez-Madrigal, Francesc Estrany, Jordi Puiggalí, Carlos Cativiela, and Carlos Alemán. Self-Assembly of Tetraphenylalanine Peptides. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 16895–16905.

Attention!!

For copyright reasons, pages 97 to 125 of the thesis, containing the text mentioned here by, should be consulted at the editor's web <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/chem.201501793/abstract>

V. SELF-ASSEMBLY OF TRIPHENYLALANINE DERIVATIVES

5.1. Diversity and hierarchy in supramolecular assemblies of triphenylalanine: from laminated helical ribbons to toroids

Abstract: Microstructures from small phenylalanine-based peptides have attracted great attention lately since these compounds are considered as a new class of tunable materials. In spite of the extensive studies on uncapped diphenylalanine and tetraphenylalanine peptides, studies on the self-assembly of uncapped triphenylalanine (FFF) are very scarce and non-systematic. In this work we demonstrate that FFF assemblies can organize in a wide number of well-defined supramolecular structures, which include laminated helical-ribbons, leave-like dendrimers, doughnut-, needle- and flower-shapes. These organizations are produced by the attractive or repulsive interactions between already formed assemblies and, therefore, can be controlled through the choice of the solvents used as incubation medium. Thus, the formation of desired supramolecular structures is regulated through the protonation / deprotonation of the terminal groups, the polarity of the incubation medium, which affects both peptide...solvent interactions and the cavity solvation energy (*i.e.* solvent...solvent interactions), and the steric interactions between the own assemblies that act as building blocks. Finally, the β -sheet disposition in the latter structural motives has been examined using both theoretical calculations and FTIR spectroscopy. Results indicate that FFF molecules can adopt both parallel and antiparallel β -sheets. However, the former one is the most energetically favored due to the formation of π - π stacking interactions between the aromatic rings of hydrogen bonded strands.

Chapter section published as article: Enric Mayans, Jordi Casanovas, Ana M. Gil, Ana I. Jiménez, Carlos Cativiela, Jordi Puiggalí, and Carlos Alemán. Diversity and Hierarchy in Supramolecular Assemblies of Triphenylalanine: From Laminated Helical Ribbons to Toroids. *Langmuir* **2017**, *33*, 4036–4048.

Attention;

For copyright reasons, pages 128 to 159 of the thesis, containing the text mentioned here by, should be consulted at the editor's web

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.langmuir.7b00622>

5.2. Hierarchical self-assembly of di-, tri- and tetraphenylalanine peptides capped with two fluorenyl functionalities: from polymorphs to dendrites

Abstract: Homopeptides with 2, 3 and 4 phenylalanine (Phe) residues and capped with fluorenylmethoxycarbonyl and fluorenylmethyl ester at the N- and C-terminus, respectively, have been synthesized to examine their self-assembly capabilities. Depending on the conditions, the di- and triphenylalanine derivatives self-organize into a wide variety of stable polymorphic structures, which have been characterized: stacked braids, doughnuts-like, bundled arrays of nanotubes, corkscrew-like and spherulitic microstructures. These highly aromatic Phe-based peptides also form incipient branched dendritic microstructures, even though they are highly unstable, making their manipulation very difficult. In opposition, the tetraphenylalanine derivative spontaneously self-assembles into stable dendritic microarchitectures made of branches growing from nucleated primary frameworks. The fractal dimension of these microstructures is ~ 1.70 , which evidences self-similarity and two-dimensional diffusion controlled growth. DFT calculations at the M06L/6-31G(d) level have been carried out on model β -sheets since it is the most elementary building block of Phe-based peptide polymorphs. Results indicate that the antiparallel β -sheet is more stable than the parallel one, the difference between them growing with the number of Phe residues. Thus, the cooperative effects associated with the antiparallel disposition become more favorable when the number of Phe residues increases from 2 to 4, while those of the parallel disposition remained practically constant.

Chapter section published as article: Enric Mayans, Gema Ballano, Jordi Casanovas, Luis J. del Valle, Maria M. Pérez-Madrigal, Francesc Estrany, Ana I. Jiménez, Jordi Puiggalí, Carlos Cativiela, and Carlos Alemán. Hierarchical self-assembly of di-, tri- and tetraphenylalanine peptides capped with two fluorenyl functionalities: from polymorphs to dendrites. *Soft Matter* **2016**, *12*, 5475-5488

Attention;

For copyright reasons, pages 161 to 196 of the thesis, containing the text mentioned here by, should be consulted at the editor's web

<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/sm/c6sm00337k#!divAbstract>

5.3. Surface mediated hierarchical assemblies of highly hydrophobic phenylalanine-based peptides

Abstract: We report the noticeable control exerted by the surface in the self-assembly of a highly hydrophobic triphenylalanine peptide with fluorenyl functionalities blocking the two ends. The remarkable differences observed among the polymorphic hierarchical assemblies obtained onto silanized glass, scratched glass, stainless steel, exfoliated mica, silicon wafer, carbon, polytetrafluoroethylene, plasma-functionalized, polystyrene and nitrocellulose substrates are consequence of the balance between peptide···peptide and peptide···surface interactions. This balance is greatly influenced by the surface characteristics, as defined by the wettability (hydrophobicity or hydrophilicity) and roughness (degree of flatness and regularity). Furthermore, very stable dendritic structures, in which primary frameworks nucleated from the center grow according to a 4-fold pseudo-symmetry branching, have been obtained onto hydrophilic treated polystyrene.

Chapter section published as article: Enric Mayans, Georgina Fabregat, Ruben Juárez, Carlos Cativiela, Jordi Puiggalí, and Carlos Alemán, Surface Mediated Hierarchical Assemblies of Highly Hydrophobic Phenylalanine-Based Peptides, *Chemistry Select* **2017**, 2, 1133–1139. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/slct.201601436/abstract>

Attention;

For copyright reasons, pages 198 to 219 of the thesis, containing the text mentioned here by, should be consulted at the editor's web

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/slct.201601436/abstract>

VI. SELF-ASSEMBLY OF POLYLACTIDE HAVING PHENYLALANINE BLOCKS

6.1. Hybrid polypeptide/poly lactide copolymers having short polyphenylalanine blocks

Abstract: Hybrid copolymers constituted by L-phenylalanine and L-lactide blocks of different length were synthesized and characterized. The diblock structure was obtained by ring opening polymerization of lactide using a macroinitiator derived from phenylalanine. This corresponded to commercial oligopeptides (from 2 to 4 units) or synthesized peptides coming from the ring opening polymerization of L-phenylalanine N-carboxyanhydride if larger sizes were necessary. The length of the PLLA block in the final copolymer was effectively controlled through the [lactide]/[macroinitiator] ratio. The effective coupling of the peptide block with the block of the biodegradable PLLA was evaluated by means of UV-Vis, FTIR, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopies, MALDI-TOF-MS and GPC techniques.

Different crystalline morphologies were attained from crystallizations. From the melt or from dilute solution. In the first case, an annealing process was necessary to decrease the nucleation sites. Positive and negative spherulites were derived as consequence of the different lamellar distribution inside spherulites (i.e. flat-on or edge-on arrangements). A high variety of structures were detected in the second case. Thus, lozenge single crystals, flower like crystals, fibrillar structures, compact spheres, ringed spherulites with a negative birefringence, dendritic structures, microfibers and braid-like microstructures were detected depending on the specific conditions (solvent, precipitant agent, temperature) and the hybrid microstructure. Some of the indicated morphologies were characteristic of self-assembled capped phenylalanine oligopeptides.

Enric Mayans, Sara Keiko Murase, Maria del Mar Pérez Madrigal,
Carlos Cativiela,* Jordi Puiggalí,* Carlos Alemán*

6.1.1 Introduction

The development of hybrid copolymers constituted by peptides and biodegradable synthetic polymers has an increasing interest for different areas, but especially in nanotechnology and biotechnology. These hybrid materials (HPBSPs) offer a possibility to combine the specific properties of biomacromolecules and synthetic polymers in a single compound.¹⁻⁵ Therefore, HPBSPs may have the advantages derived from each building block: economy, solubility, melt processability or versatility from the synthetic block and capacity to adopt secondary structures, self-assembling properties, functionality, high mechanical performance or biodegradability from the peptide block. In fact, HPBSPs are becoming crucial for the development of new bioactive hydrogels (e.g. those sensitive to external stimuli or with programmable responses), orthopaedic devices, biomolecular drugs and biosensors.⁶⁻¹¹

Great efforts have been focused to the synthesis of polymer bioconjugates via the ligation of peptides on synthetic polymers.^{5,12-15} The simple way to synthesize HPBSP bioconjugates is probably the “grafting from” approach where a macromonomer is used to initiate the polymerization process. In this way, only a small component needs to be coupled to the selected macroinitiator, which can be either the peptide or the synthetic polymer, after which the second block is grown in a stepwise fashion.

Considerable works have been addressed on the synthesis of peptide-based conjugates, but few of them has been focused on copolymers containing peptide and polyester blocks. More representative examples are triblock copolymers of poly(ϵ -caprolactone), polylactide (PLA), poly(dimethyl trimethylene carbonate) or poly(trimethylene carbonate) blocks at both central or terminal positions and blocks constituted by different amino acids.^{16,17} Diblock structures constituted by PLA and poly(γ -benzyl-L-glutamate) have also been evaluated.¹⁸

PLA has some advantages to be employed as a biodegradable synthetic block in HPBSPs due to its good properties and even to its capacity to adopt well defined structures that finally may influence on the final self-assembly properties of the derived HPBSP. Therefore, the PLA homopolymer is widely employed as both commodity (e.g., packaging materials and films) and specialized (e.g. biomedical devices like implants and drug delivery systems) applications. In fact, PLA has the main characteristics that are usually required for a degradable polymer to be employed as a biomaterial: good mechanical properties, biocompatibility, degradability, non-toxicity of degradation products, and even versatility in synthesis.²⁰ Thus, PLA can be prepared by ring-opening and condensation polymerizations depending on the selected monomers (e.g. lactide or lactic acid). When PLA is synthesized from a specific stereoisomer (e.g. PLLA produced from L-lactide) the derived material may reach a certain level of crystallinity, about

40%, which logically influences on the degradation behaviour and mechanical properties. Processing and crystallization conditions become fundamental to determine the amorphous content and the specific crystalline phase. Different structures (α , α' , β and γ phases) have been postulated depending on the chain conformation (i.e. a three-fold helix and a 10_3 helix) and their packing mode.²¹⁻²⁵ In any case, the conformational preferences of PLLA may have some influence on the self-assembly properties of the derived HPBSP.

Incorporation of peptide blocks into a synthetic polymer chain may favour self-assembling due to the marked conformational preferences of such segments, which usually lead to helical or sheet-like structures, and also to their capability to establish strong hydrogen bonding intermolecular interactions through amide groups. In this way, derived morphologies may range from nanotubes, self-assembled monolayers, fibers and spherulites depending on the length of the peptide as well as on the involved amino acids. Surprisingly, L-phenylalanine blocks have scarcely been employed for peptide-based copolymers, being the diblock structures with poly(ethylene glycol)²⁶ and even a second peptide (e.g. poly(benzyl L-glutamate)²⁷ and poly(L-glutamic acid)²⁸ representative examples. In fact, L-phenylalanine has a great potential to form supramolecular structures as a consequence of the additional aromatic stacking interactions that can be established and plays a fundamental role in the formation of amyloid fibrils that are characteristic of a wide diversity of diseases.²⁹⁻³¹

Different works have been performed in the last years in order to understand the self-assembly mechanism of phenylalanine derivatives. Probably, the formation of nanotubular structures from the Phe-Phe dipeptide is one of the initial and most relevant works,³¹⁻³² but merits also attention the formation of well-defined dendritic structures when the substrate used to perform self-assembling is conveniently selected.³³ In addition, it has been found that morphology of phenylalanine derivatives may depend on the number of residues³⁴ and its parity (i.e. even or odd),³⁵ the presence and type of terminal groups³⁶ and the substrate surface.^{33,37} In summary, the characteristics of the phenylalanine peptide, the type of substrate, the polarity of the solvent and the peptide concentration in the solution may lead to a wide variety of self-assembled morphologies that include nanotubes, doughnut-like, needle-like and chrysanthemum-like structures, leaf-like dendrimers, flat plates, nanotubes, helical fibrils, stacked toroids and spherulites.

The present work deals with the preparation of diblock copolymers constituted by phenylalanine and lactide and the evaluation of the crystalline morphologies and the self-assembling characteristics of copolymers having blocks of different length. This becomes a pioneering research that is justified by both the applied interest of the new chimeras and the capability of the two involved blocks to adopt different molecular assemblies.

Synthesis of phenylalanine blocks are usually performed through the ring opening polymerization of α -amino acid *N*-carboxyanhydrides (α -NCAs) since it possibilities the generation of peptides with a targeted molecular weight in a controlled manner.³⁸⁻⁴² Different strategies have been developed for preparing α -NCAs, being the first methods based on phosgene which is an exceedingly toxic gas. Therefore, the use of triphosgene⁴¹ has been progressively imposed since this crystalline solid can be more safely handled and stored. Moreover, residual traces of it can be easily removed from the final product by recrystallization of the prepared NCA.⁴³ In fact, it has recently been reported that the self-assembly organization of PLLA chains can be guided by peptide moieties having only one or two phenylalanine amino acid units.⁴⁴

Diblock copolymers based on PLLA and polyphenylalanine (PPhe) have recently been synthesized using a PLLA macroinitiator to perform the ROP of L-phenylalanine NCA.⁴⁵ These diblock copolymers can also be obtained using a peptide macroinitiator to perform the ROP of lactide, which is the approach followed in the present paper. In this way, peptides of different length were synthesized according to a controlled polymerization of α -NCAs or purchased when small sequences were involved (i.e. di, tri and tetraphenylalanine commercial peptides).

6.1.2. Results and discussion

Synthesis of PPhe blocks

The peptide block was successfully obtained by means of the target L-Phe-NCA prepared from triphosgene and L-phenylalanine. ROP of L-Phe-NCA was initiated by benzylamine as a primary amine, which was specifically chosen due to its similarity with the peptide chain. In addition, benzylamine appeared more effective than hexylamine, which is the initiator most usually employed.⁴⁶ High molecular weights can therefore be obtained at a moderated temperature (e.g. 60 °C).

Molecular weights and specifically the degree of polymerization (DP) of synthesized peptides was evaluated by ¹H NMR spectroscopy (Table 1). Basically, the intensities of the -CH₂- group (4.30 ppm) of the benzylamine terminal unit and the well differentiated signals of -CH- group (4.89 ppm) of the Phe unit were used in the calculations. In all cases, experimental values were lower than expected, being not discarded a problem related to the solubility of molecules having the higher number of phenylalanine units. In fact, the ratio between experimental and theoretical DPs decreased from 0.79 to 0.63 as the number of Phe units increased for samples obtained at the same polymerization temperature (i.e. 60 °C). Conversion of reactions was also evaluated through the ¹H NMR spectra taken during syntheses. To this end CH (4.89 ppm) and NH (9.1 ppm) signals of PPhe and Phe-NCA, respectively, were considered. Final conversions (Table 1) were always high and ranged between 0.80 and 0.97.

Table 1. Reaction conditions for ROP of L-Phe-NCA and final degrees of polymerization.

Name	M/I ratio ^a	<i>Mn</i> ^b (g/mol)	Temperature (°C)	Time (h)	Conversion ^c (%)	DP _{Phe} ^d	<i>Mn</i> ^e (g/mol)
PPhe ₄	20	3047	40	24	87	3.3	592 ^f
PPhe ₈	10	1577	60	48	80	7.8	1254
PPhe ₁₅	20	3047	60	48	94	14.8	2283
PPhe ₂₅	40	5987	60	48	96	25	3782
PPhe ₃₀	45	6722	80	48	97	33.3	5002

Degrees of polymerization were also evaluated by MALDI-TOF mass spectrometry (Figure 1). However, the low solubility of molecules having a great number of phenylalanine units (even in trifluoroacetic acid or 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol) caused a partial ionization of the sample and rendered mass spectra with a considerable noise. Molecular weights (not shown) were lower but at the same magnitude order that those deduced from ¹H NMR spectra, specially for high molecular weight samples. Nevertheless, mass spectra were interesting since depicted clear signals with mass difference of L-Phe residues (i.e. 147.1 g/mol) indicating a good polymerization of L-Phe-NCA towards the formation of peptides. In addition, series of signals associated to copolymers charged with a proton or a potassium cation and also to the ionization of the benzyl group were detected. The main signals of the spectra corresponded to lower weights than the average value determined from ¹H NMR spectra but signals associated to higher molecular weights could also be detected. Thus, Figure 1 shows that the maximum intensity signal for PPhe₁₅ corresponds to a molecular weight of 1470 g/mol while the maximum molecular weight peak was detected at 3528 g/mol, values that are in relatively agreement with the theoretical value of 3047 g/mol and the NMR value of 2283 g/mol.

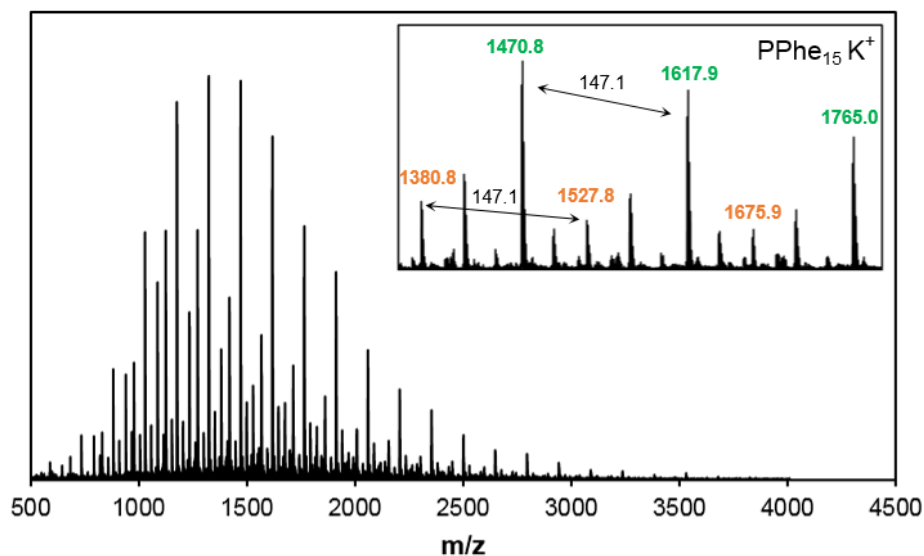


Figure 1. MALDI-TOF-MS spectrum of PPhe₁₅. Inset shows a magnification of a small area and indicates the presence of differently charged copolymers. The highest signal corresponded to a molecular weight of 3528 g/mol.

Table 2. Molecular weight and block lengths of synthesized hybrid samples.

Name	Time (days)	M/I ^a	M_n^b (g/mol)	M_w^b (g/mol)	PDI ^b	Conversion ^c (%)	DP _{PLLA} ^d	Peptide ^d (wt-%)
PPhe ₂ - <i>b</i> -PLLA ₄₅	5	25	3500	5.300	1.5	87	45	8
PPhe ₃ - <i>b</i> -PLLA ₁₅	5	10	1540	2200	1.4	85	15	29
PPhe ₄ - <i>b</i> -PLLA ₂₂	6	15	2190	3500	1.6	83	22	26
PPhe ₈ - <i>b</i> -PLLA ₅₅	6	30	5100	7000	1.4	88	55	22
PPhe ₁₅ - <i>b</i> -PLLA ₅₀	7	30	5800	14400	2.5	85	50	37
PPhe ₂₅ - <i>b</i> -PLLA ₁₀₀	7	50	11000	26100	2.4	83	100	33

^a Ratio between lactide and initiator (L-Phe or the corresponding peptide) introduced in the reaction flask.

^b Values determined by GPC.

^c Calculated from ¹H NMR of as-synthesized samples using -CH- and -CH₃ peaks of L-lactide and PLLA.

^d Calculated from ¹H NMR of purified samples using -CH- PLLA signals of inner and terminal units.

^e Number of lactic acid units calculated from ¹H NMR of purified samples using -CH- signals of PLLA and PPhe units.

The influence of temperature was evaluated performing reactions at the same M/I ratio and polymerization time. Specifically, a set of polymerizations were conducted using a M/I ratio of 40 during 48 h and temperatures that ranged between 25 °C and 80 °C. Logically, the degree of polymerization increased with temperature, but also the occurrence of secondary reactions and other backbiting issues were detected in the ¹H NMR spectra when temperature was higher than 60 °C. Short peptides could be obtained under milder temperature conditions but required and increase on the initiator ratio and lead to a DP clearly lower than expected (Table 2). Although primary amine-initiated reactions have a living character (i.e. amino end groups remain active

and continue to grow when new monomer is added), the synthesis of oligomers with controlled variable sizes could be achieved by controlling the M/I ratio at a certain temperature.

Synthesis of hybrid copolymers from Phe macroinitiators

Anionic ROP of L-lactide rings was performed through the active -NH_2 groups of both the synthesized and the commercial PPhe peptides under typical reaction conditions (temperature of 135 °C and inert nitrogen atmosphere). The scarce solubility of PPhe in the bulk polymerization medium obligated to high polymerization times and a strict control of the occurrence of possible secondary reactions and degradation processes. For this purpose, ^1H NMR and IR spectra were taken at regular polymerization times, and the molecular weight was intended to be determined. ^1H and ^{13}C NMR spectra of the different copolymers were always in full agreement with the expected chemical structure as shown in Figure 2 for a representative sample. Unfortunately, no specific signals attributed to the Phe-Lac pair could be detected and consequently no proof about the effective copolymerization could be obtained from NMR spectra.

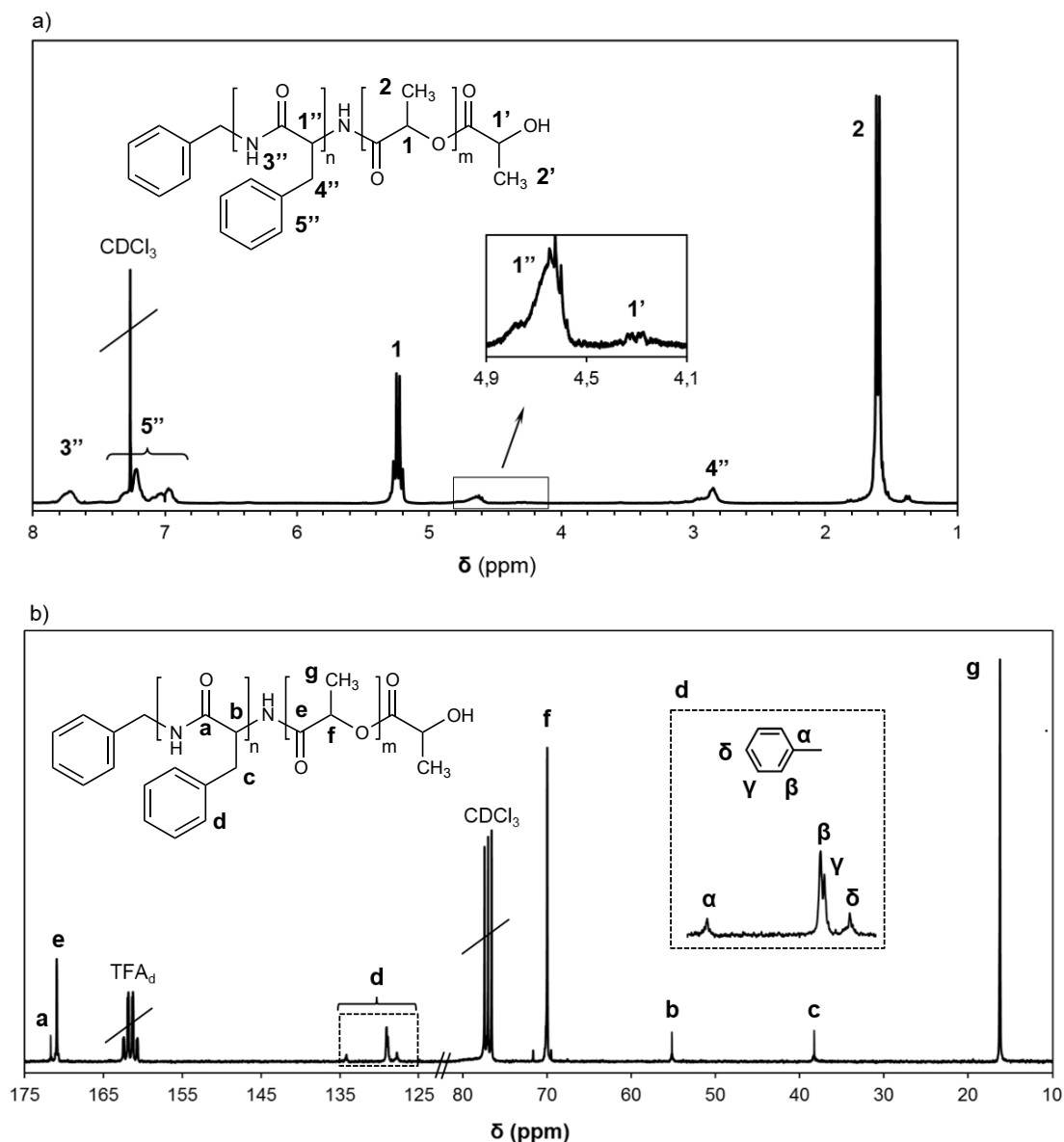


Figure 2. ^1H (a) and ^{13}C NMR (b) spectra of the representative PPh₂₅-*b*-PLLA₁₀₀ sample.

CH and CH₃ protons corresponding to the L-lactic acid unit of the copolymer were observed at 5.23 ppm and 1.60 ppm, respectively (Figure 2a). These signals appeared well distinguished from the related groups belonging to the lactide monomer (i.e. 5.17 ppm and 1.71 ppm for CH and CH₃, respectively), being therefore possible to follow the conversion percentage during the ROP of lactide. Optimal reaction time was selected from NMR conversion data and GPC molecular weight measurements in order to get a high conversion, chain lengths in maximum agreement with the M/I initiator ratio and to avoid molecular degradation. Final conversions in the 83%-88% range could be attained (Table 2) for reaction times between 5 and 7 days.

In addition, the CH proton associated to the terminal L-lactic acid unit could be seen at 4.35 ppm, allowing the calculation of the number of lactoyl units in the PLLA blocks (DP_{PLLA} in Table 2) when the area of the signal at 5.23 ppm was taken also into account.

Peaks associated to the Phe unit could be observed in both ^1H and ^{13}C NMR spectra. For example, in the case of ^1H NMR (Figure 2a), peaks assigned to NH, C_6H_5 , CH and CH_2 protons appeared at 7.79 ppm, 7.34-7.10 ppm, 4.64 ppm and 2.85 ppm, respectively. Areas of CH signals of the peptide (4.62 ppm) and PLLA (5.23 ppm) were used to determine the peptide content percentage in the synthesized copolymers as summarized in Table 2.

Some representative data concerning molecular weight and architecture are summarized in Table 2 for representative hybrid copolymers obtained from both synthesized and commercial oligopeptides (polymers are denominated using as subscripts the number of phenylalanine and lactoyl units). It is clear that the molecular size, peptide percentage and length of the PLLA block could be well controlled through the M/I ratio and the size of the selected macroinitiator. Molecular sizes obtained by GPC were in good agreement with the PPhe and PLLA block lengths determined by ^1H NMR spectroscopy but in general were lower than expected from the M/I ratio. This feature suggests that usual side reactions of ROP took place more pronouncedly and affected the final molecular weight due to the long reaction times required. In addition, the prepared copolymers were in some cases hardly dissolved in HFIP (i.e. those with the higher peptide percentage), leading to a molecular weight subestimation by GPC analysis.

FTIR spectra of the synthesized hybrids showed clear signals associated to each block when their proportion was reasonably high. Thus, Figure 3 compares the spectrum of $\text{PPhe}_{25}\text{-}b\text{-PLLA}_{100}$ with the spectra of PLLA and PPhe homopolymers. Characteristic bands of PLLA and phenylalanine were clearly observed in the copolymer as well as in samples containing lower peptide content (i.e. $\text{PPhe}_{15}\text{-}b\text{-PLLA}_{50}$ and $\text{PPhe}_8\text{-}b\text{-PLLA}_{55}$, not shown). Furthermore, the spectrum of the hybrid copolymer showed peaks located at 1209 and 921 cm^{-1} (see arrows in Figure 3), which are associated to the typical 10_3 helical conformation of PLLA.

The change of solubility of the different PPhe oligomers after reaction with lactide is probably the clearer observation that strengthens effective reaction between both blocks species. The peptide block based in phenylalanine is commonly known to be practically insoluble in a high number of solvents as the number of residues increases. TFA must be used to completely dissolve the prepared peptides due to the rupture of hydrogen bonding interactions between the amide groups. In the case of the hybrid copolymers, CHCl_3 could solubilize samples with a low peptide percentage and only partially those with a high percentage. However, a complete dissolution was still feasible in this case by addition of a small ratio of TFA in the solvent medium.

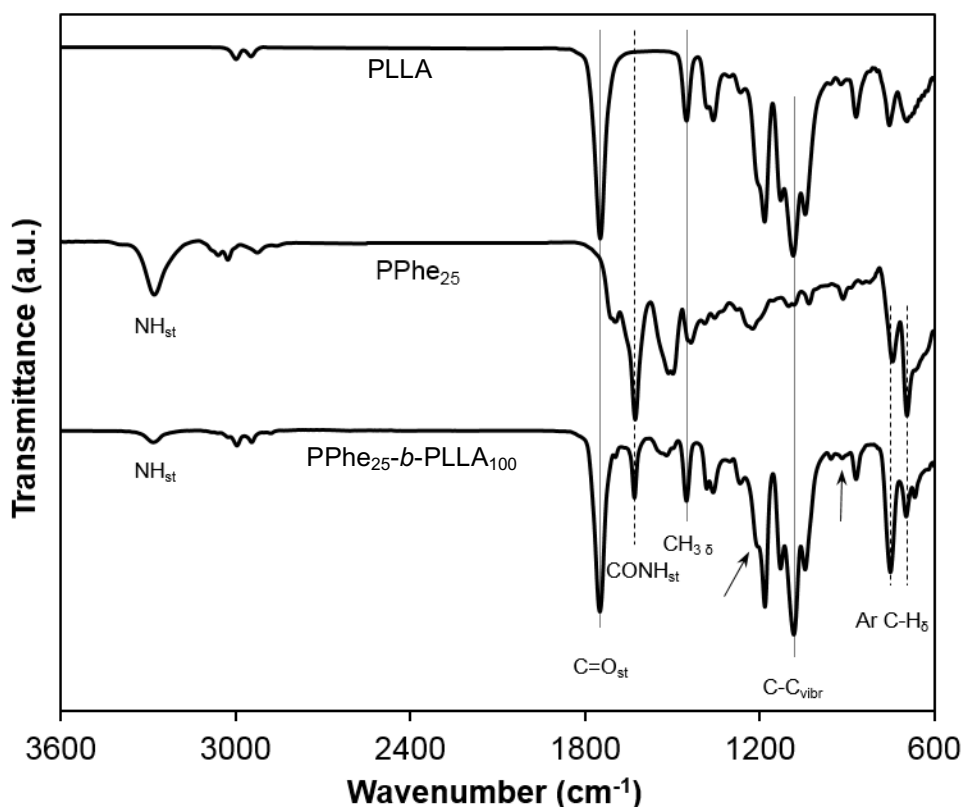


Figure 3. FTIR spectra of PLLA, PPhe₂₅ and the PPhe₂₅-*b*-PLLA₁₀₀ hybrid sample.

UV-Vis spectroscopy was employed to confirm that PPhe initiators were effective for ROP of lactide. Therefore, peaks associated with the aromatic rings of phenylalanine gave rise to five peaks at 246, 250, 256, 262 and 266 nm that could be detected in the spectra of purified hybrids. Figure 4 shows representative spectra of one of the synthesized peptides (PPhe₈) and three hybrid copolymers (PPhe₈-*b*-PLLA₅₅, PPhe₁₅-*b*-PLLA₅₀ and PPhe₂₅-*b*-PLLA₁₀₀). In addition, the spectrum of a crystalline commercial PLA is included for comparison purposes and to show that any peak could be observed in the 240-270 nm range. The intensity of aromatic peaks has some correlation with the phenylalanine content despite solubility problems of such samples still exist. Nevertheless, peaks were more intense in the spectrum of PPhe₁₅-*b*-PLLA₅₀ having a phenylalanine content of 37 % than in the spectrum of PPhe₈-*b*-PLLA₅₅ with a content of 22 %.

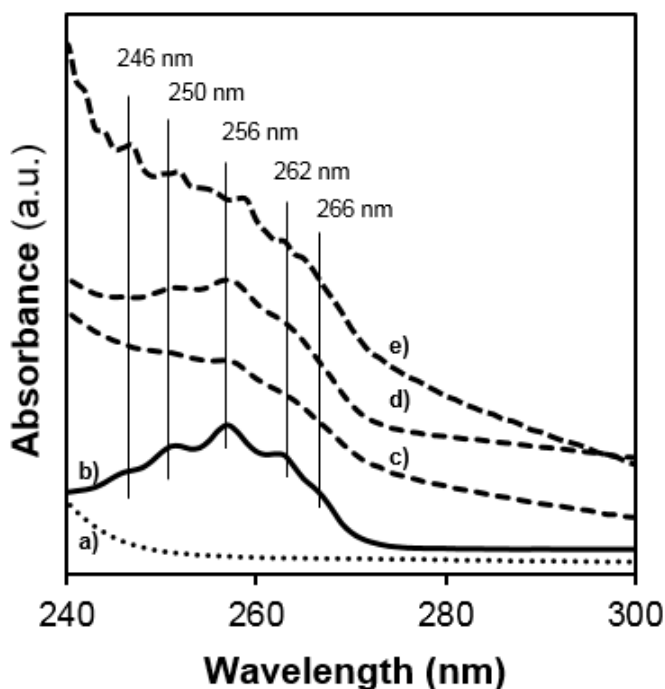


Figure 4. UV-Vis spectra of a commercial PLLA (a), synthesized PPhe₈ (b), PPhe₈-*b*-PLLA₅₅ (c), PPhe₁₅-*b*-PLLA₅₀ (d) and PPhe₂₅-*b*-PLLA₁₀₀ (e).

Structure of PPhe-*b*-PLLA hybrids

Synthesized hybrids were highly crystalline according to their powder X-ray diffractogram where characteristic peaks associated to the polylactide crystalline phase were detected as well as some peaks associated to the phenylalanine phase when its content was sufficiently high (Figure 5). Thus, typical Bragg reflections associated with the α -form of polylactide (10₃ helical conformation) could always be observed. The most intense reflections were detected at 0.547, 0.470, and 0.403 nm, being indexed as the (200) + (110), (203) and (015) reflections of the characteristic orthorhombic lattice ($a = 1.078$ – 1.075 , $b = 0.645$ – 0.604 and c (chain axis) = 2.78 – 2.88 nm) of the α -form.²¹

Thus, the presence of PPhe blocks could not disturb the crystallization of polylactide even for a weight percentage of such blocks as higher as 37% (Figure 5). A reflection at 1.186 nm was also observed, even for short PPhe blocks (e.g. three units), with variable relative intensity compared to the characteristic PLLA peak at 0.547 nm. The intensity of such reflection logically increased with the phenylalanine content. The calculated spacing was greater than the expected value for the chain axis period of peptide having the typical 2₁ conformation associated to a β -sheet structure (*i.e.*, 0.70 nm),⁴⁷ and was probably related to the intersheet spacing where the voluminous aromatic groups should be placed.

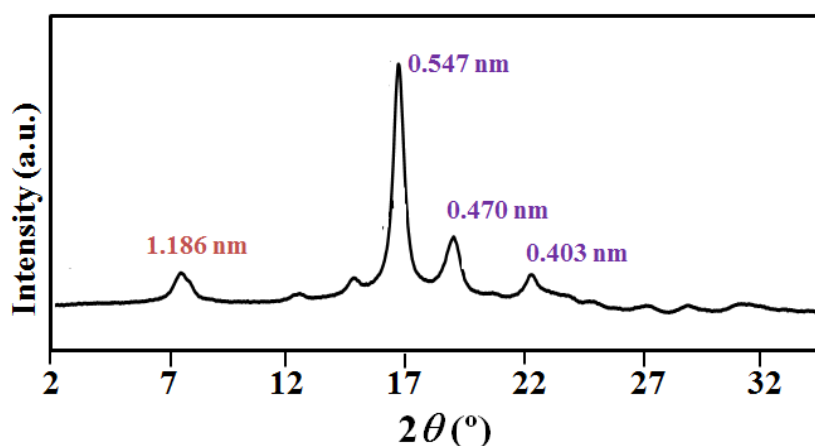


Figure 5. X-ray diffraction profile of the PPhe₁₅-*b*-PLLA₅₀ hybrid with a 37 wt-% of phenylalanine units.

Thermal properties of PPhe-*b*-PLLA hybrids

Thermal stability of the different samples was evaluated by thermogravimetric analysis. In general, the different hybrids showed two degradation steps that could be assigned to PLLA and PPhe blocks. The first step involved the greater mass loss (i.e. >70%), appeared at temperatures lower than 300 °C and was associated to PLLA blocks. The second step was more significant for the PPhe richer sample and logically decreased when this content did. Figure 6 compares the TGA and DTGA traces of PPhe₈-*b*-PLLA₅₅ hybrid (i.e. a copolymer with a short PPhe block) and the peptide with the same length (i.e. PPhe₈). For the shake of completeness, the TGA curve of a commercial PLLA sample is also provided. The peptide started to degrade earlier (i.e. the deviation from the flat baseline occurred at 140 °C with respect to the temperature of 164 °C determined for the hybrid). Although differences were not highly significative, the onset degradation temperatures are relevant since are close to the reaction temperature selected for the ROP of lactide. Therefore, this temperature must be strictly controlled in order to avoid the decomposition of the peptide used as initiator and the unbalancing of the M/I ratio. Fortunately, the formed hybrids were stable at such reaction temperature and specially when longer L-lactide blocks were involved.

DTGA curves are also depicted in Figure 6 since allow elucidating the occurrence of the different degradation steps. In this way, PPhe₈ had a single DTGA peak temperature at 377 °C, a value that is clearly higher than the peak temperature associated to the peptide block of the PPhe₈-*b*-PLLA₅₅ hybrid (i.e. 340 °C). This observation seems logical since decomposition may be enhanced by the products resulting from the previous degradation of the PLLA block. This block had also a lower thermal stability with respect to the commercial PLLA sample (i.e. DTGA peaks were observed at 276 °C and 377 °C), but is in agreement with previously reported results concerning low molecular weight PLLA samples (i.e. 270 °C was determined for molecules having 50 lactoyl

units).²⁴ The high ratio of terminal groups favours the PLLA degradation process for which it has just been described a first step associated to the decomposition of terminal groups.^{48,49} In this way this short block appear thermally stabilized in the hybrid due to the peptide block attachment. In summary, the stability of the two constitutive blocks of the synthesized copolymers was always lower than of the related high molecular weight homopolymers, a factor that must be considered when the selected hybrids were exposed to further treatments involving high temperatures.

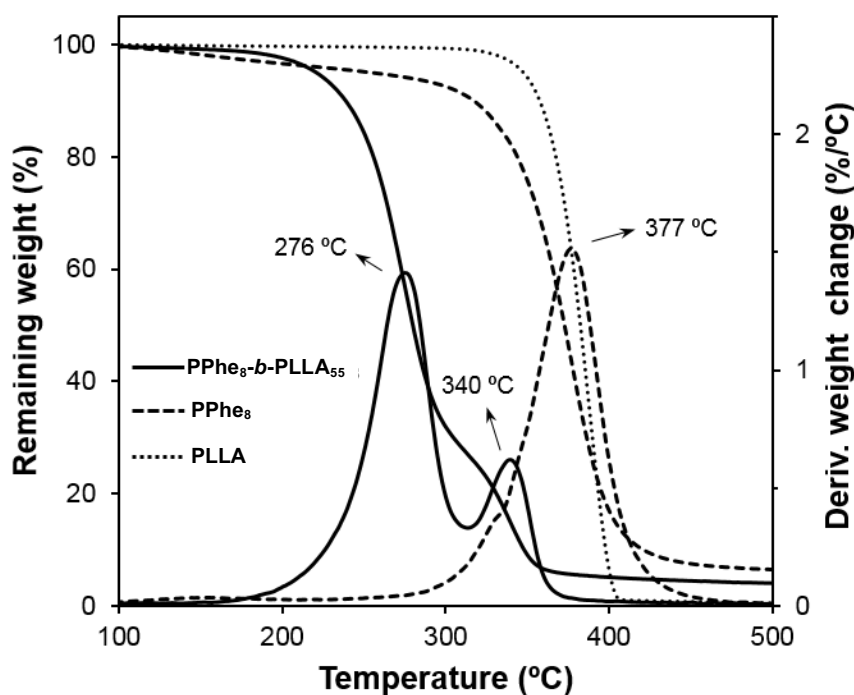


Figure 6. TGA and DTGA curves for the PPhe₈-*b*-PLLA₅₅ hybrid and PPhe₈. TGA curve of commercial PLLA is also plotted.

Calorimetric characterization of the new hybrid copolymers was performed according to a well-established protocol that involves different heating and cooling scans as shown in Figure 7 for the PPhe₈-*b*-PLLA₅₅ hybrid. A single melting peak associated to the fusion of the PLLA crystalline phase was observed in the different heating scans performed with all synthesized copolymers. Nevertheless, a small shoulder, indicative of a typical lamellar reorganization of PLLA, could be envisaged in some cases. Melting peaks associated to a peptide crystalline phase could not be detected despite X-ray diffraction data pointed out the existence of a crystalline order. Probably, thermal degradation took place before the melting temperature of the PPhe blocks was reached. All hybrids were semicrystalline when obtained from synthesis, but crystallized with difficulty from the melt state as it is well known for polylactide. Therefore, a clear cold crystallization peak could be observed in a subsequent heating run. Quenching from the melt rendered practically amorphous samples as can be deduced from the corresponding heating trace where similar enthalpies were determined for cold crystallization and melting peaks. Although the thermal

behaviour showed similar general trends for all the synthesized samples, some differences could be found among them as summarized in Table 3 for some representative samples. Thus, glass transition temperature logically decreased with the decrease of the molecular weight, but this variation was scarce and a value in the 50 °C-55 °C range was characteristic. Namely, a temperature clearly lower than observed for commercial PLLA samples due to the low size of the involved blocks. In addition, the increase on the Phe content lead to a lower crystallinity, a greater difficulty to crystallize from the melt and less well formed PLLA crystalline domains as evidenced from the lower values of the melt (i.e. 35 J/g with respect to 6.7 J/g) and cold crystallization (i.e. 23.0 with respect to 19.2) enthalpies, the increase on the temperature of the cold crystallization peak (i.e. from 97 °C to 106 °C) and the decrease on the melting temperature (i.e. from 141 °C to 128 °C).

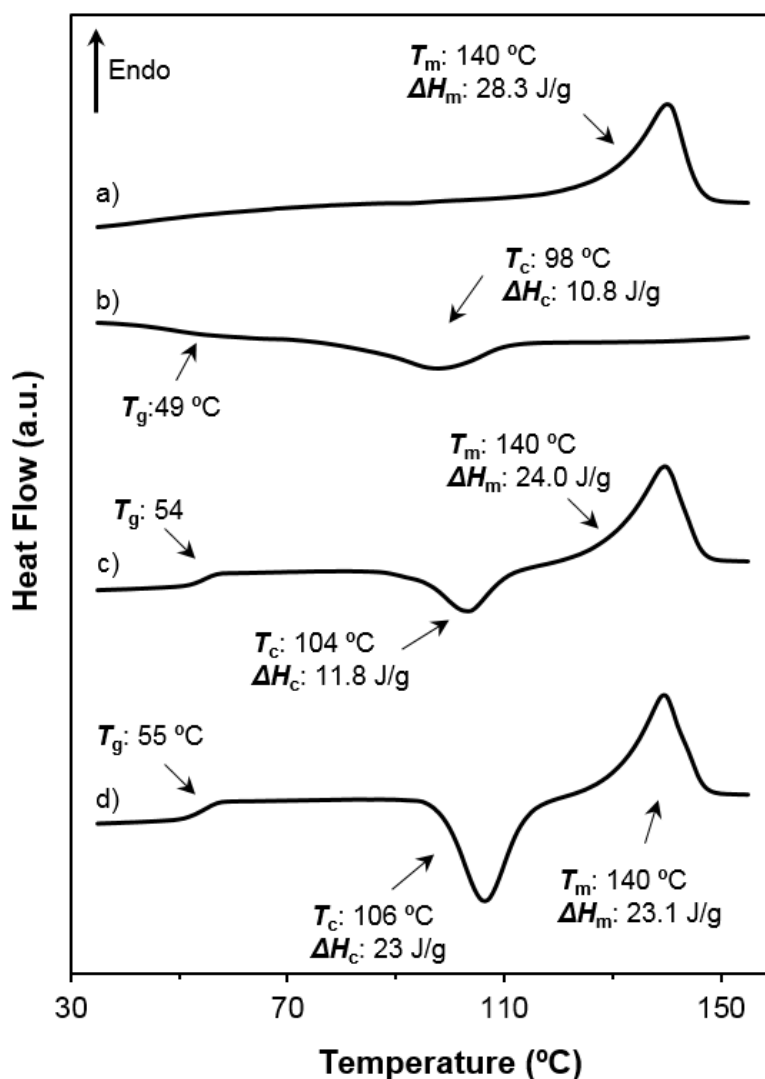


Figure 7. DSC traces for the PPh₈-b-PLLA₅₅ hybrid showing a first heating scan of the solution purified sample (a), the cooling run from the melt state after keeping the sample for 5 minutes above fusion (b), the second heating scan of the melt crystallized sample (c) and finally a third heating run of a sample previously quenched from the melt state (d).

Table 3. Calorimetric data of representative hybrid copolymers.^a

Sample	T _g (°C)	T _c (°C)	ΔH _c (J/g)	T _m (°C)	ΔH _m (J/g)
PPhe ₂ - <i>b</i> -PLLA ₄₅	51	97	23.0	141	35
PPhe ₈ - <i>b</i> -PLLA ₅₅	55	106	22.5	139	23
PPhe ₁₅ - <i>b</i> -PLLA ₅₀	54	97	19.2	128	6.7
PPhe ₂₅ - <i>b</i> -PLLA ₁₀₀	54	106	20	132	21.3

^a Obtained in a heating run after quenching.**Morphology of melt crystallized hybrids**

Isothermal crystallization of the synthesized hybrids rendered very small spherulites even at low supercooling degrees. In fact, a large number of nucleation sites appeared due to the low molecular weight of the samples and especially to the presence of phase heterogeneities which could be consequence of the self-assembly of the peptide block moieties. The protocol of the crystallization process was modified in order to diminish the nucleation density and avoid a fast crystallization.^{50,51} To this end the melted sample was quickly cooled to a chosen annealing temperature where phase separation took place. The number of active nuclei (associated to the peptide assembly) in the PLLA phase could therefore be decreased during the subsequent isothermal crystallization performed after heating again the sample above its melting temperature. The annealing temperature was chosen slightly higher than the temperature of beginning of the crystallization process (i.e. the end of the crystallization peak in the cooling DSC trace) and obviously lower than the temperature of the beginning of fusion. The available temperature interval was consequently very narrow and a temperature of 120 °C – 125 °C seemed appropriate for the different samples as can be deduced from Figure 8 for the representative PPhe₈-*b*-PLLA₅₅ sample.

Peculiar spherulites were obtained as displayed in the optical micrographs of the melt crystallized hybrid. Logically crystallization temperature had a determinant influence on the size of spherulites as a consequence of the increasing nucleation with the supercooling degree. Thus, diameters close to 400-600 μm could be reached at temperatures close to the annealing temperature (e.g. 120 °C for morphologies shown in Figures 8d and 8e), whereas the size decreased up to 150 μm (Figures 8f) when the temperature was close to the beginning of the crystallization peak in the DSC trace recorded at a cooling rate of 10 °C/min (i.e. 115 °C). Sizes of 200-250 μm were observed at intermediate temperatures (e.g. 118 °C, Figures 8a, 8b and 8c). Spherulites had always a positive birefringence, which contrast with the usual negative sign of typical fibrillar spherulites of PLLA where polymer chains had a tangential orientation due to the edge-on deposition of the constitutive lamellae. Thus, the distinctive birefringence of the hybrid

copolymers suggests a different arrangement of lamellar crystals (i.e. flat-on versus edge-on) inside each spherulite. In fact, umbrella-like spherulites constituted by flat-on lamellae could always be detected. Crystallizations performed at 118 °C rendered spherulites where the radial lamellae become branched giving crystals at certain tilting angles (i.e. close to 60°, see ellipsoids in Figure 8b). Therefore, these small branches showed an opposite birefringence to that detected for the radial crystals, as can be clearly observed in the polarized micrographs taken with a first order tint plate (see ellipsoid in Figure 8c). This branching was more evident in the smaller spherulites obtained at lower temperature, giving rise to a highly confusing birefringence (Figure 8f). Micrographs of larger spherulites obtained at the highest temperature were highly interesting since the umbrella-like morphology was clearly detected as well as the constitutive diamond-shaped vanes (Figures 8d and 8e) associated to flat-on lamellar crystals.

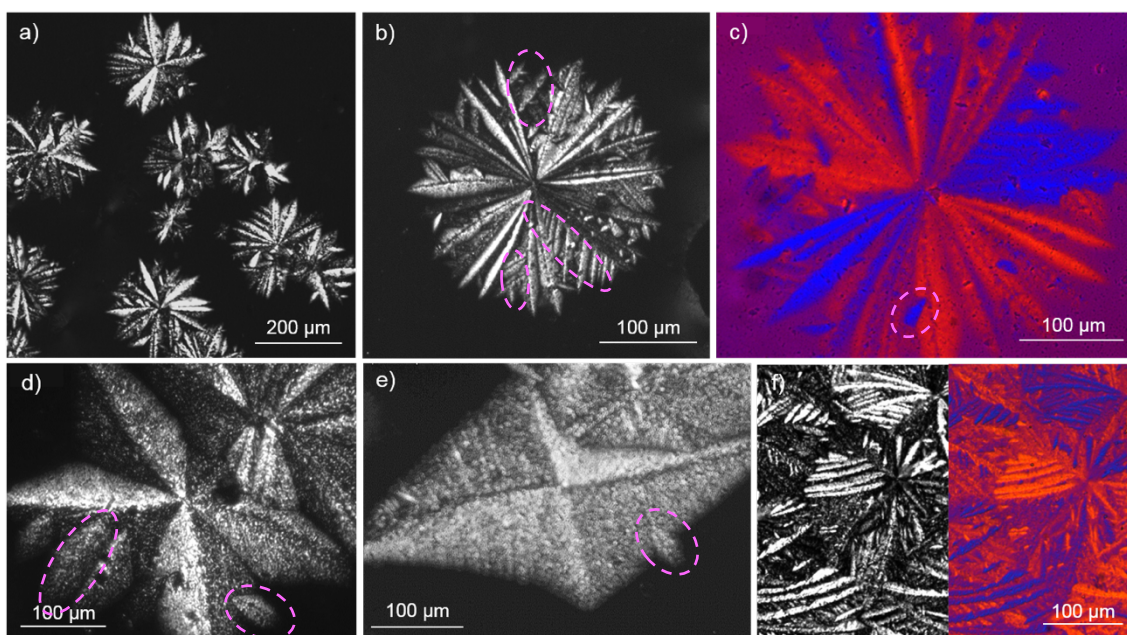


Figure 8. Optical micrographs of PPh₂₅-*b*-PLLA₁₀₀ spherulites obtained in isothermal crystallizations from the melt state at 118 °C (a-c), 120 °C (d-e) and 115 °C (f). Ellipsoids points out the formation of branched crystals from the main radial lamella.

Hybrid block copolymers having short PPhe blocks displayed a differentiated morphology as shown in the optical micrographs displayed in Figure 9. Thus, PPhe₂-*b*-PLLA₄₅ gave rise to banded spherulites with the expected negative birefringence that is characteristic of PLLA. This hybrid can be considered as a simple low molecular weight PLLA and consequently its typical morphology should be expected. The observed bright bands correspond to lamellae with an edge-on disposition whereas the dark bands are associated to flat-on lamellae. Size of spherulites increased with crystallization temperature and specifically diameters close to 300 μm and 2000 μm were observed for crystallizations performed at 115 °C (Figure 9a) and 125 °C (Figure 9b). By contrast the separation between bands decreased and values of 85 μm and 70 μm were

measured. The increase of the PPhe block length clearly influenced the morphology of spherulites as can be deduced from PPhe₃-*b*-PLLA₄₄ (Figure 9c), PPhe₄-*b*-PLLA₆₀ (Figure 9d) and PPhe₅-*b*-PLLA₅₀ (Figure 9e) hybrids crystallized at 115 °C. Birefringence of such spherulites was always negative but a banded structure was hardly detected and the morphology became progressively more irregular at the same time that the diameter decreased with the PPhe content. Thus, values of 300 μm, 220 μm, 115 μm and 40 μm were measured for hybrids with two, three, four and five units, respectively. Interesting morphologies were observed when PPhe₅-*b*-PLLA₅₀ was crystallized at a temperature as high as 135 °C. In this case, hexagonal aggregates with a size close to 150 μm (logically higher than observed for crystals produced at 115 °C) were formed. A detailed inspection allows to observe that these aggregates were constituted by lath-shaped flat-on lamellae that even gave rise to rhombic frames (see ellipsoids in Figure 9f). It should be pointed out that these hexagonal aggregates showed a positive birefringence as above described for the umbrella-like spherulites (Figure 8) characterized also by the planar disposition of lamellae.

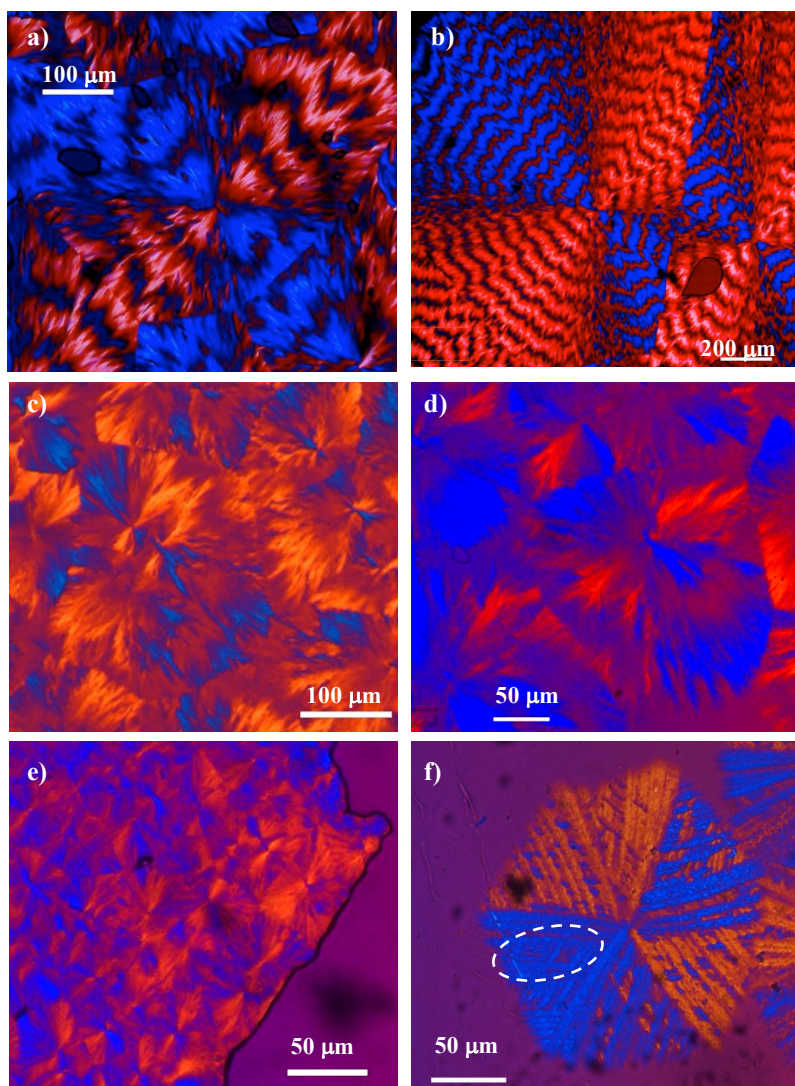


Figure 9. Polarized optical micrographs of PPhe₂-*b*-PLLA₄₅ (a,b), PPhe₃-*b*-PLLA₄₄ (c), PPhe₄-*b*-PLLA₆₀ (d) and PPhe₅-*b*-PLLA₅₀ (e,f) spherulites crystallized at 115 °C (a,c,d,e), 125 °C (b) and 135 °C (f).

Morphologies from dilute solutions

Crystallization/precipitation from dilute solutions allows developing single entities and minimize the problems associated to the characteristic high nucleation of melt crystallization. Furthermore, a wide variety of morphologies could be attained in function of the block that initiates crystallization, which could depend on the selected combination of solvent and precipitating agent. The study was limited in this case to copolymers with small PPhe blocks (i.e. from 2 to 5 units) due to solubility problems and low molecular weight in order to enhance the influence of the PPhe block and also to favour self-assembling and development of crystals.

Slow evaporation at room temperature of dichloromethane solutions of the PPhe₂-*b*-PLLA₂₂ copolymer (concentration of 10 mg/mL) rendered typical PLLA crystals with a lozenge morphology and an angle of 120° between their {110} faces (Figure 10). These crystals had a multiterrace appearance, indicating the AFM micrographs and the corresponding height profiles the existence of individual lamellae with a thickness close to 3.5 nm from. This thickness was lower than the length of the molecular chain and therefore folding took place despite the low molecular weight. Interestingly, polarizing optical micrographs demonstrated that crystals had a positive birefringence in agreement also with deductions taken from the aggregates given in Figure 8. It is clear that typical PLLA crystals could be attained despite the presence of PPhe units and the moderate size of the PLLA block.

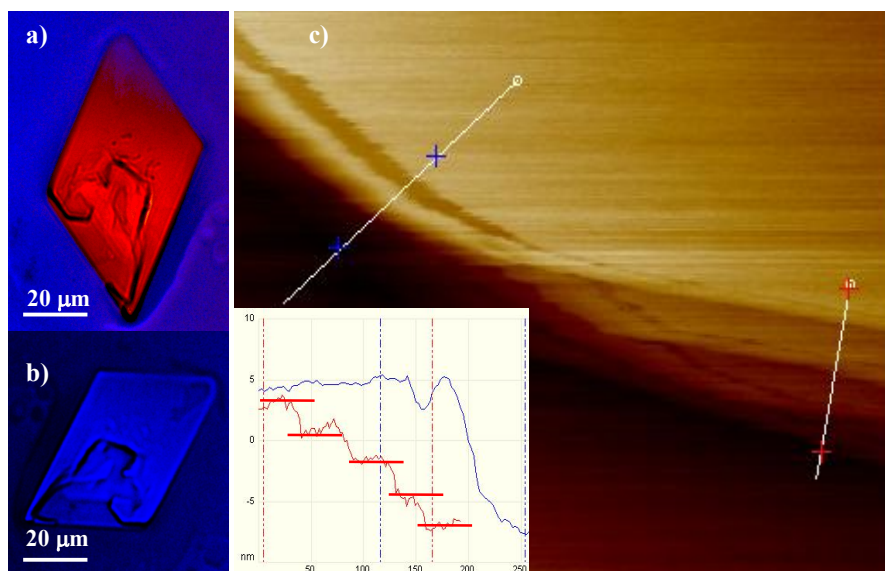


Figure 10. Lozenge crystals of PPhe₂-*b*-PLLA₂₂ obtained by evaporation of dichloromethane solutions. Polarizing optical micrographs (a,b) show the change of birefringence according the orientation of the crystal. AFM micrograph show a multi-layered distribution (c) and a regular height (d).

Spherulitic morphologies were preferably obtained when the size of the PLLA block was increased as a consequence of the increased viscosity of the solution. The best developed structures were obtained by evaporation at room temperature of tetrahydrofuran solutions at the same polymer concentration (10 mg/mL). Figure 11 shows that lozenge single crystals characterized by a nucleation centre (see blue arrows in Figure 11a) could still be observed but the predominant structure corresponded to spherulites with a ringed texture and a negative birefringence sign (Figure 11b). The presence of fibrils was characteristic in agreement with an edge-on lamellar structure (see red arrows in Figures 11b-11e) and the observed negative birefringence. SEM micrographs (Figures 11c and 11d) showed that the ringed appearance was derived from the crystallization on progressive circular fronts originated by the evaporation of the solvent. The development of radial aggregates that become progressively split can be well observed in Figure 11d (see blue circles), whereas the regular disposition of these aggregates constituted by edge-on crystals can be envisaged in the AFM image (Figure 11e).

The increase on the crystallization rate induced by the addition of a precipitation agent gave rise to worse morphologies that varied from spheres derived from a typical phase separation in a bad solvent (Figure 12a), flower-like aggregates of lozenge crystals (Figure 12b) or fibrillar aggregates (Figure 12c). Phase separation was characteristic of drastic conditions provided by low temperature (4 °C), high precipitant ratio (i.e. a THF:H₂O 1:9 mixture was employed) and low PLA content (e.g. PPhe₂-*b*-PLLA₂₂), whereas higher temperatures (25 °C), low precipitant content (THF:H₂O 4:1) and high PLA content (e.g. PPhe₂-*b*-PLLA₄₅) favoured the development of single crystals. Crystallization was also affected by the ionic content of the medium and consequently distinctive fibrillar aggregates were in this case developed (Figure 12c).

Formation of dendritic structures was also a general characteristic of the studied copolymers as shown in the optical micrographs and the AFM images given in Figure 13 for the PPhe₃PLLA₂₀ hybrid. Similar structures have been reported for low molecular weight PLLA⁵² but are also formed in the self-assembling of capped tetraphenylalanine oligomers.³⁶ Finally, it should be indicated that morphologies not usual in PLLA, but in contrast reported from the self-assembly of phenylalanine oligomers³⁴⁻³⁷ were also observed when hybrids with short PLLA blocks were obtained from evaporation of dichloromethane solutions and subsequent thermal treatment (Figure 14). Specifically, straight microfibers with a diameter in the 2-3.5 µm range (Figure 14a) were observed together with stacked braid-like microstructures. Microfibers were constituted by the assembly of several nanofibers as determined from the height profiles of AFM images (inset of Figure 14a). The braid-like microstructures appeared in the boundaries of the glass coverslips in a similar way than were detected for the crystallization of phenylalanine oligomers, a feature as was explained by means of a complex assembly caused by the presence of multiple interfaces.³⁶⁻³⁷

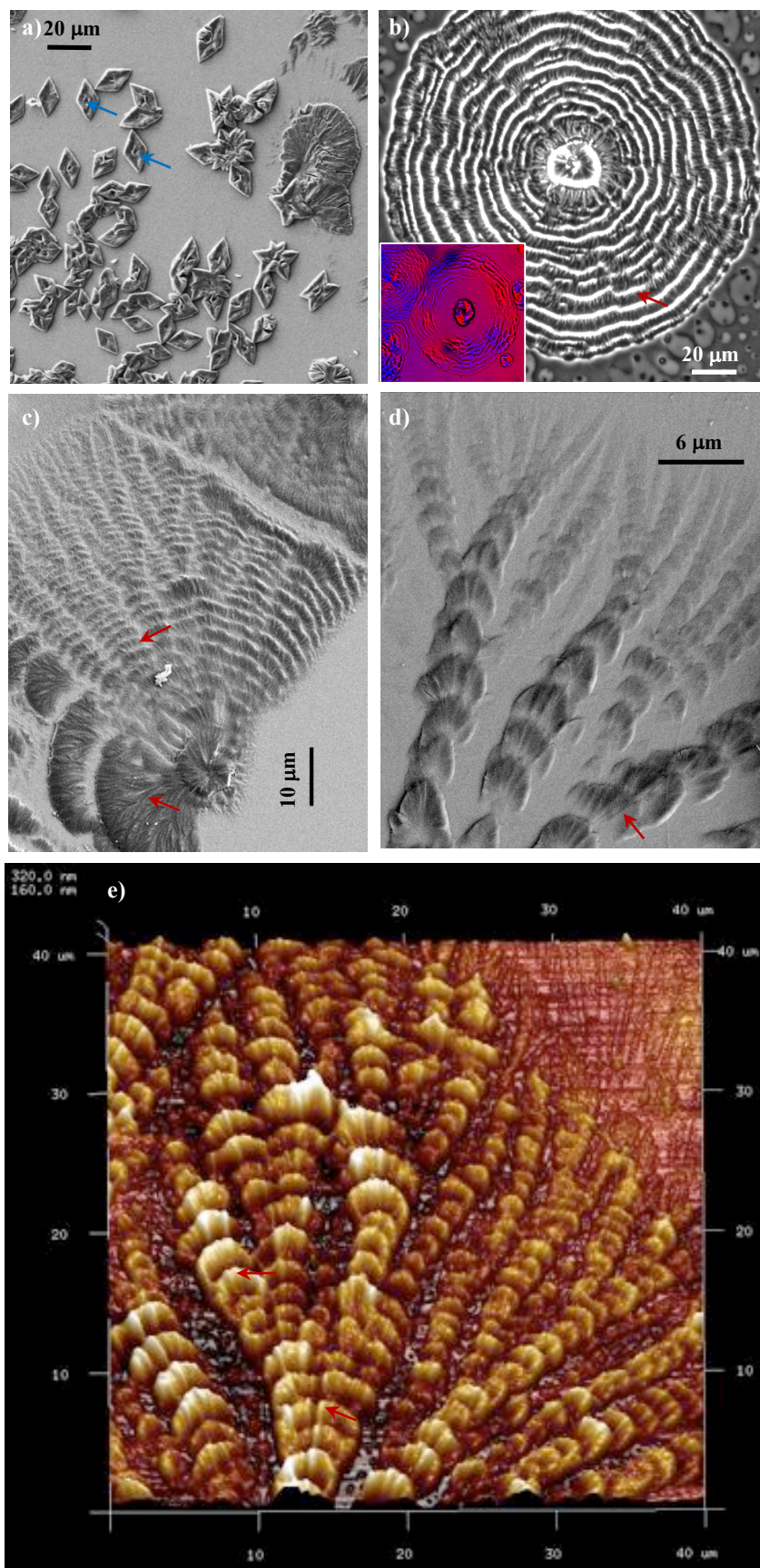


Figure 11. Typical PPhe₂-b-PLLA₄₅ morphologies obtained by slow evaporation of dichloromethane solutions. SEM (a, c, d), optical (b) micrographs and AFM images show the development of lozenge crystals (a) and spherulitic aggregates (b-d).

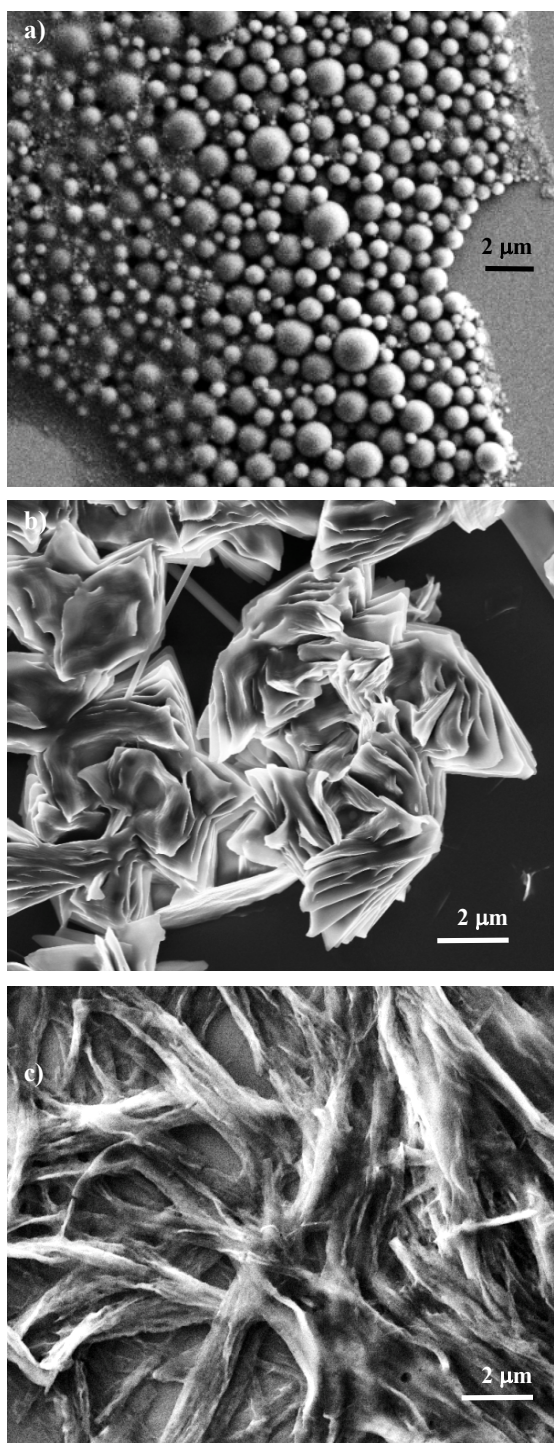


Figure 12. a) Spheres of PPHe₂-*b*-PLLA₂₂ obtained by crystallization from a THF:H₂O 1:9 mixture at 4 °C, b) Flower-like morphology of PPHe₂-*b*-PLLA₄₄ obtained by crystallization from a THF:H₂O 4:1 mixture at 25 °C, c) Fibrillar aggregate of PPHe₂-*b*-PLLA₂₂ obtained by crystallization from a THF:H₂O 1:9 mixture at 25 °C after addition of a equimolar Na₂CO₃ 0.5 M solution. In all cases the final polymer concentration was 10 mg/mL.

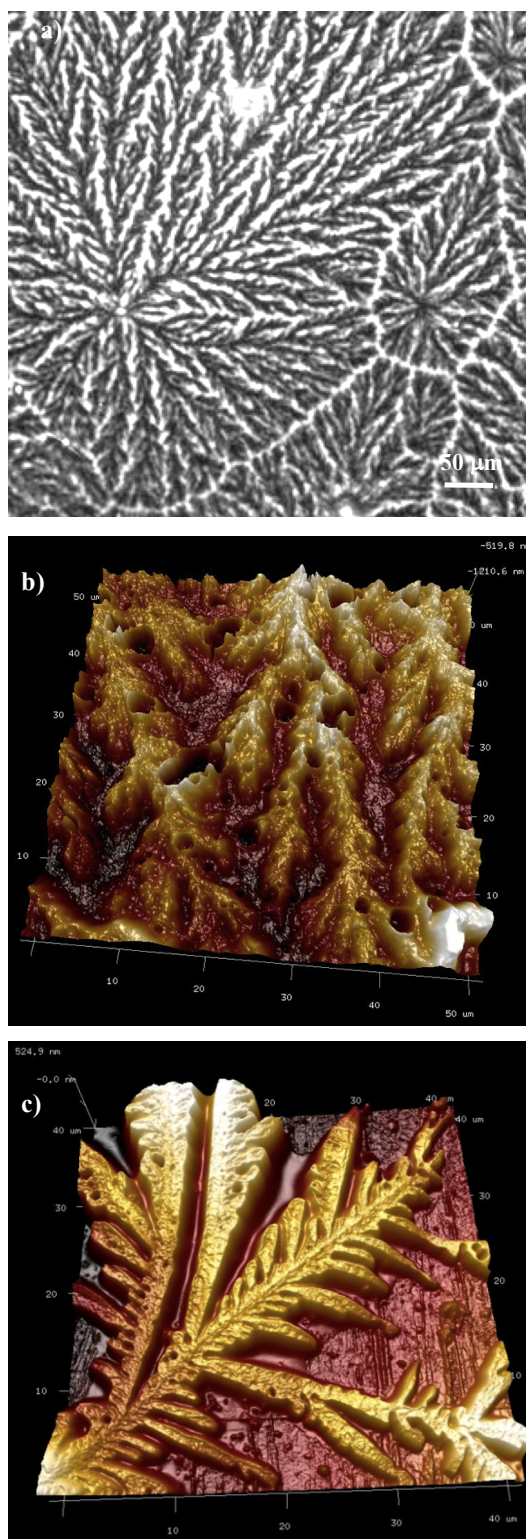


Figure 13. Optical micrograph (a) and AFM images (b,c) of dendrites obtained for the PPhe₃PLLA₂₀ in THF:H₂O 1:9 and the addition of an equimolar Na₂CO₃ solution (a,b) and CH₂Cl₂/CH₃OH 1:1 (c). (The final) Polymer concentration in the solvent mixtures was always 5 mg/mL.

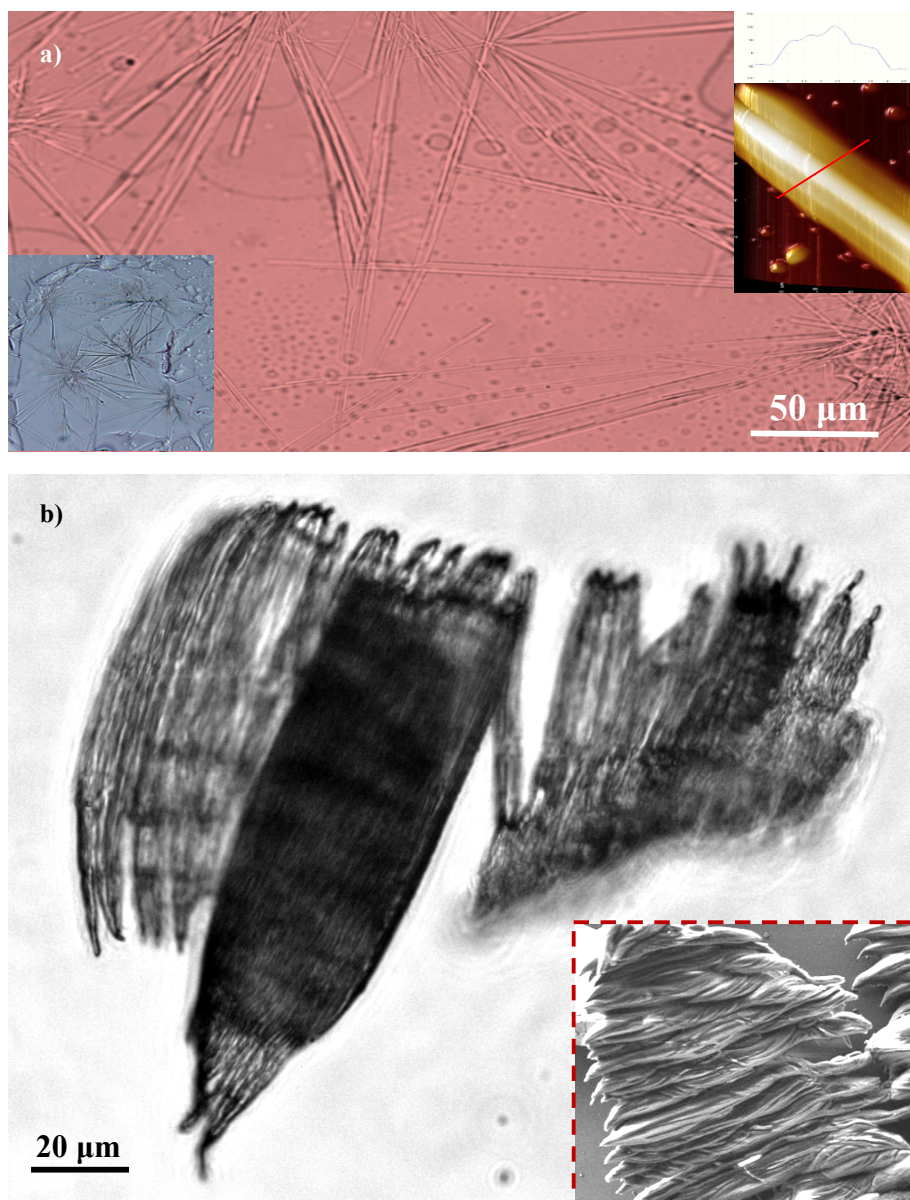


Figure 14. a) Optical micrograph showing straight microfibers of PPhe₂PLLA₂₀ obtained from evaporation at 25 °C of dilute polymer solutions (10 mg/mL) in CH₂Cl₂ and subsequent treatment at 120 °C for 12 h. Insets correspond to a low magnification to show a complete spherical aggregate and AFM image of a microfiber with the corresponding height profile. b) Optical micrograph of complex aggregates also obtained under the above indicated conditions. Inset shows a SEM micrograph of such type of aggregate.

6.1.3. Conclusions

The use of phenylalanine macroinitiators for the ring opening polymerization of lactide has been revealed effective to get diblock copolymers. The size of the peptide and the polylactide blocks can be well controlled through the monomer/initiator ratio used in the two polymerization steps: the ROP of Phe-NCA using butylamine as initiator and the ROP of lactide using the macroinitiator. The main problem of the selected methodology is the scarce solubility of the

macroinitiator in the lactide medium and therefore the high reaction time required. Hybrids were synthesized with a lactide content higher than 63 wt-%, being crystalline with a predominant phase corresponding to the α -form of PLLA. Nevertheless, X-ray diffraction peaks associated to the peptide structure could also be detected. DSC traces showed only crystallization and melting peaks of the PLLA phase, indicating that peptide assemblies decomposed during heating before reaching their fusion. Hybrids were thermally degraded according to two decomposition steps, which could be associated to each constitutive block. The onset of degradation was relatively low and consequently a strict control on the reaction temperature was essential to avoid the occurrence of degradation during synthesis. Crystallization from the melt, which was characterized by a high nucleation that could be avoided by inducing a phase separation through an annealing process, gave rise to spherulites with a distinctive lamellar disposition (i.e. flat-on or edge-on) and birefringence (i.e. negative or positive) in function of the length of the PPhe block. Crystallization from diluted solutions opened a wide variety of possibilities (control of temperature, concentration, solvent and precipitant agent) that led to a great diversity of crystalline morphologies. The most usual ones corresponded to single crystals and spherulites typically observed with PLLA, but also morphologies previously reported in the self-assembling studies of phenylalanine could be observed.

6.1.4. Experimental Section

Materials. L-lactide was purchased from Sigma-Aldrich, recrystallized three times from ethyl acetate, stored at 8 °C under nitrogen atmosphere and dried in vacuum before use. Mono, di, tri and tetraphenylalanine were purchased from Bachem and stored at 0 °C. Triphosgene and benzylamine were purchased from Sigma-Aldrich and stored also at 0 °C. The transesterification catalyst 4-(dimethylaminopyridine) (DMAP) was provided by Sigma-Aldrich. Commercial PLLA (PLA 2002D) was supplied by Natureworks®. The number average molecular weight and polydispersity index were 98,100 g/mol and 1.85, respectively, as determined by GPC measurements.

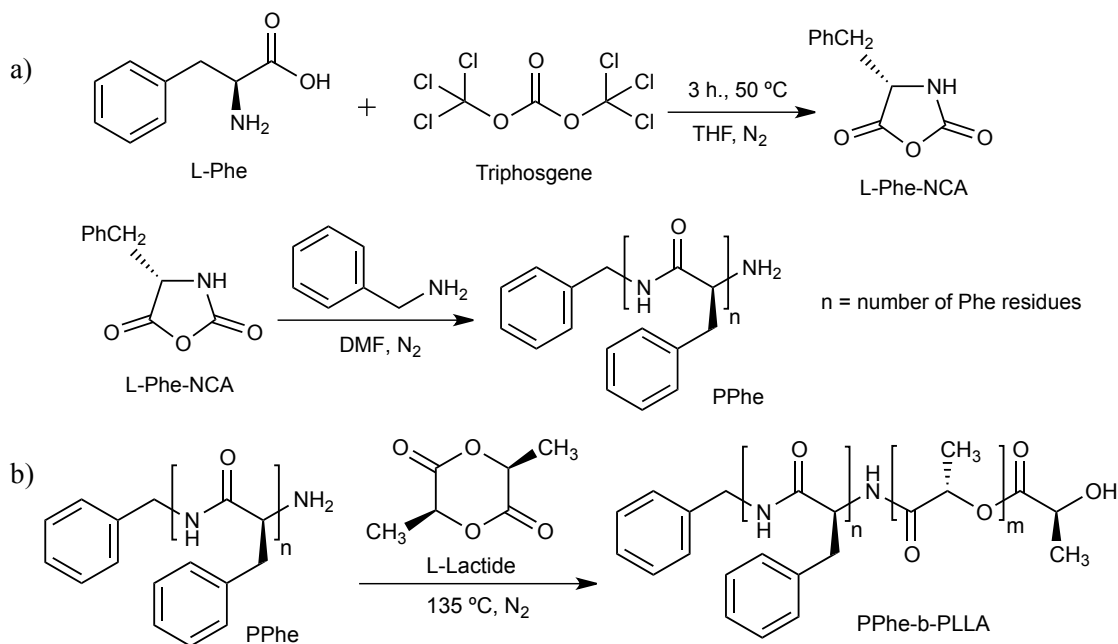
Hexane of extra pure grade was purchased from Fisher. Methanol (CH₃OH), dichloromethane (CH₂Cl₂) and tetrahydrofuran (THF) anhydrous solvents were purchased from Sigma-Aldrich and used as received. All other solvents of analytical grade were purchased from Panreac and used as received.

Dialysis tubes, Zellu Trans Roth V Serie, based on regenerated cellulose membrane (MWCO 1,000, 3,500 or 5,000 g/mol) and the ZelluTrans/Roth standard clips were both acquired from Carl Roth.

To avoid side reactions due to high sensitivity of amino acid *N*-carboxyanhydrides to -OH ends of the inner walls of the glassware, all reaction flasks and tubes were silanized. Then, treated glassware and magnetic stirrers were stored at 140 °C until use.

Synthesis of phenylalanine based peptides. L-Phe-NCA was prepared following the previously described Fuchs-Farthing modified method (Scheme 1a),^{42,43} which proceeds as continues: 10 g of L-phenylalanine were dissolved in 100 mL of anhydrous THF in a round bottom flask with nitrogen atmosphere. 6 g of triphosgene were dissolved in 30 mL of anhydrous THF and added dropwise to the initial solution by means of a pressure-equalizing dropping funnel. The reaction took place for 3 hours at 50 °C with a stream of nitrogen. The obtained solution was filtered to withdraw the unreacted L-Phe and the clear solution was reprecipitated in dry hexane and vacuum filtered. The obtained L-Phe-NCA powder was kept under vacuum and 0 °C.

The second step consists in the preparation of the phenylalanine-based block (PPhe) using a primary amine initiator. The number of L-Phe units in the peptide will be in subscripted format to designate the prepared PPhe. Synthesis of PPhe₂₅ is reported as an example. 1 g of previously prepared Phe-NCA was dissolved in anhydrous DMF in a round bottom flask under nitrogen atmosphere. Benzylamine was added into the septum sealed flask with a syringe in monomer/initiator ratio (M/I) = 40. The reaction took place at 60 °C for 48 hours. At the end of the reaction time the product was reprecipitated by dropwise addition of anhydrous diethyl ether at 0 °C. The obtained solid was then filtered in a filter plate and dried under vacuum. Peptides of different sizes were prepared varying reaction temperature, time and M/I ratio (see Table 1).



Scheme 1. Synthesis schemes for the preparation of PPhe homopolymer (a) and the PPhe-*b*-PLA diblock copolymer (b).

L-Phe-NCA: Yield: 52 %. ^1H NMR (300.1 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.10 (s, 1H, NH), 7.20 (m, 5H, Ph), 4.79 (t, 1H, CH), 3.04-3.02 (d, 2H, CH_2), IR (ATR)($\tilde{\nu}$, cm^{-1}): 3280 (NH st), 1834-1769 (C=O st), 1496-1455 (Ar C=C), 1364 (CH_3 b).

PPhe₂₅: Yield: 85 %. ^1H NMR (300.1 MHz, TFA-d_4): δ = 7.20 (d, 25H, Ph of PPhe₂₅), 7.07-7.01 (d, 1H, Ph of benzylamine), 4.89 (s, 5H, $\text{COCH}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{NH}$), 4.30 (s, 0.4H, NHCH_2Ph of benzylamine), 2.90 (s, 10H, CH_2Ph of PPhe₂₅). IR (ATR)($\tilde{\nu}$, cm^{-1}): 3280 (NH st), 3028-2926 (Ar C-H st), 1700 (C=O st), 1628 (amide I), 1520 (amide II), 1498 (Ar C=C st), 743 (Ar C-H δ), 694 (Ar C-H δ).

Phenylalanine initiated ring opening polymerization of lactide. Different strategies have been carried out to get copolymers having short (i.e. from 2 to 4 units) and long phenylalanine blocks (Scheme 1b). In all cases the ROP of lactide was carried out in bulk.

a) ROP of L-lactide initiated by L-phenylalanine commercial peptides:

Hybrids were synthesized following a procedure previously described.⁴⁴ Specifically, 1.5 g of dried L-phenylalanine oligopeptide initiator were introduced in a silanized reaction tube. The lactide/initiator molar ratio was 25-10:1, depending on the required size for the PLLA segment. The reaction mixture was firstly kept under a nitrogen stream for ten minutes and then the tube was sealed. Reaction was performed in an oil bath at a temperature of 135–140 °C under magnetic stirring and left for 7-5 days. Shorter times were sufficient for the more fluid reaction mixtures having a higher ratio of lactide (i.e. for hybrid copolymers having large PLLA segments and obtained with a M/I ratio close to 25). Furthermore, in this case a 2.5 % molar ratio of DMAP as transesterification catalyst was added. Polymerization was finally stopped by cooling on ice. The reaction crude was then dispersed in chloroform and filtered through a 0.2 μm -pore membrane filter in order to remove the unreacted peptide initiator. The solution was washed three times with a 5 % NH_4Cl solution and five times with water if the DMAP catalyst was added. The obtained pale solids were purified by twice re-precipitation with cold methanol or *n*-hexane for long and short PLLA blocks (i.e. a number of lactoyl units greater and lower than 25, respectively). Solids were finally recovered by centrifugation, vacuum dried and milled to get a vitreous white powder.

b) Synthesis of copolymers from long oligopeptide initiators:

The bulk polymerization performed to get PPhe₂₅-*b*-PLLA₁₀₀ is described as an example of the procedure followed to get larger phenylalanine blocks: 1.5 g of L-lactide and 0.8 g of the initiator PPhe₂₅ (i.e. a lactide/initiator molar ratio of 50), were introduced in a glass reaction tube sealed with a septum, pumped-filled for three times and finally charged with nitrogen. The tube was then introduced in a silicon bath at 135 °C and magnetically stirred. Samples were taken at certain

times (from 3 to 7 days) to determine the time required to get the highest molecular weight and conversion (i.e. 168 h). The resulting copolymer was dissolved in methanol and recovered by centrifugation (10,000 rpm). The process was repeated two more times. The resulting powder was dialyzed in chloroform during 3-4 days. The external solvent was changed once with fresh chloroform and at the end, the internal solvent was rotoevaporated to recover the polymer.

PPhe₂₅-*b*-PLA: 97 %. ¹H NMR (300.1 MHz, CDCl₃ + TFA): δ = 7.79 (s, 25H, NH), 7.34-7.12, 7.10-6.87 (m, 125H, Ph), 5.23 (q, 99H, CHCH₃), 4.64 (m, 25H, CHCH₂), 4.35 (m, 1H, CH(CH₃)OH, terminal L-lactide unit), 2.85 (s, 50H, CH₂Ph), 1.60 (d, 297H, CHCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃ + TFA): δ = 171.5 (C=O, peptide block), 170.9 (C=O, PLLA block), 133.6, 129.1, 128.9, 127.5 (phenyl group), 55.1 (CHCH₂), 38.4 (CHCH₂), 16.2 (CHCH₃). IR (ATR)(ν , cm⁻¹): 3280 (NH st), 2997-2944 (CH₃ st), 1749 (C=O st), 1631 (CO st, amide I), 1522 (CO-NH, amide II), 1452 (CH₃ δ), 1360 (CH δ), 1184 (C-O st), 1086 (C-C vibration), 1043 (C-C vibration), 748 (Ar C-H δ), 697 (Ar C-H δ).

Measurements

Molecular weights and polydispersity index (PDI) were estimated by gel permeation chromatography (GPC) using a liquid chromatograph (Shimadzu, model LC-8A) equipped with an Empower computer program (Waters). A PL HFIP gel column (Polymer Lab 300 x 7.5 mm) and a refractive index detector (Shimadzu RID-10A) were employed. The polymer was dissolved and eluted in 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP) containing CF₃COONa (0.05M) at a flow rate of 0.5 mL/min (injected volume 100 μ L, approximate sample concentration 1.5 mg/mL). The number and weight average molecular weights were calculated using polymethyl methacrylate standards.

Infrared absorption spectra were recorded with a Fourier Transform FTIR 4100 Jasco spectrometer in a 4000-600 cm⁻¹ range. A Specac-Teknokroma model Golden Gate attenuated total reflection (ATR) set-up with a heated Single Reflection Diamond ATR Top Plate was also employed.

¹H NMR and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker AMX-300 spectrometer operating at 300.1 and 75 MHz, respectively. Chemical shifts were calibrated using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. Deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-d₆) δ (¹H) = 2.5 ppm was used as solvent for NCA samples, deuterated trifluoroacetic acid (TFA-d) δ (¹H) = 11.5 ppm was employed for polypeptides and deuterated chloroform (CDCl₃) δ (¹H) = 7.24 ppm was used for hybrid copolymers. TFA was added to the block copolymers to completely solubilize the samples.

MALDI-TOF-MS was performed on a 4800 *Plus* MALDI TOF/TOF (ABSciex - 2010). A MALDI solid state laser (Nd:YAG) (355 nm, 200 Hz, 3-7 ns pulse) was employed as ionization

source. The analyser was TOF/TOF (time-of-flight) in reflector mode operation. The spectra were obtained in the positive ion mode. The samples were prepared via the dried droplet spotting technique. Sample preparation protocol was as follows: 2 mg of copolymer were dissolved in 50 μL of concentrated TFA. A mixture of 10 μL of dithranol (27 mg/mL in THF) and 1 μL of potassium trifluoroacetate (salt additive) (5 mg/mL in THF) was used as a matrix. 1 μL of the mixture of polymer solution/matrix solution 1/1 (v/v) was spotted on the MALDI sample plate and allowed to dry at ambient temperature before the analysis.

UV–Vis spectroscopy was performed using a Shimadzu UV-3600 ultraviolet-visible spectrometer in the 200 to 400 nm range from diluted polymer solutions in 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol. Differential scanning calorimetry analyses (DSC) were recorded on a TA Instruments Q100 series at rate of 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (heating scans) and 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (cooling scans) under nitrogen. DSC calibration was performed with indium. Thermal degradation was studied at a heating rate of 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ with around 2 mg samples using a Q50 thermogravimetric analyzer of TA Instruments and under a flow of dry nitrogen. Test temperatures ranged from 30 to 600 $^{\circ}\text{C}$.

Spherulitic morphologies obtained from the melt state were analysed by optical microscopy using a Zeiss Axioskop 40 Pol light polarizing microscope equipped with a Linkam temperature control system configured by a THMS 600 heating and freezing stage connected to a LNP 94 liquid nitrogen cooling system. A first-order red tint plate was employed to determine the sign of spherulite birefringence under crossed polarizers. Micrographs were taken with a Zeiss AxiosCam MRC5 digital camera. Very thin films from melted powder of purified product were prepared and then introduced in the hot stage to grow spherulites with the determined protocol. Copolymer containing solutions were prepared from 10, 50 or 100 mg/mL stocks. The solvents used to dissolve the synthesized peptides were dichloromethane or tetrahydrofuran (THF). In the specified cases, in order to enhance the crystallization/precipitation (of the copolymer), methanol or Milli-Q water (respectively) were added at once and the final solution was vortexed. The concentration of copolymers in the prepared final solutions ranged from 0.1 to 10 mg/mL. Finally, 20 μL aliquots were placed on microscope coverslips and kept at room temperature (25 $^{\circ}\text{C}$) or inside a cold chamber (4 $^{\circ}\text{C}$) until dryness.

X-Ray powder diffraction patterns were obtained with a PANalytical X'Pert PRO MPD θ/θ powder diffractometer with Cu K α radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) and a silicium monocrystal sample holder. Operating voltage and current were 40 kV and 50 mA, respectively. Thin samples sandwiched between low absorbing films were used.

Topographic AFM images were obtained using a Dimension 3100 Nanoman atomic force microscope from Veeco (NanoScope IV Controller), under ambient conditions in tapping mode. AFM measurements were performed on various parts of the morphologies, which produced

reproducible images similar to those displayed in this work. Scan window sizes ranged from $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ to $20 \times 20 \mu\text{m}^2$.

Acknowledgements

The authors thank MINECO and FEDER (MAT2015-69367- R, MAT2015-69547-R, and CTQ2013-40855-R), the Generalitat de Catalunya (2014SGR188) and Gobierno de Aragón-FEDER (research group E40). Support for the research of C.A. was received through the prize “ICREA Academia” for excellence in research funded by the Generalitat de Catalunya.

Keywords: Ring-opening polymerization, biodegradable polymers, hybrid copolymers, polylactide, polyphenylalanine, self-assembling, crystalline morphologies.

6.1.5. References

- [1] M. Morell, J. Puiggalí, *Polymers* **2013**, 188-224.
- [2] H. Schlaad, M. Antonietti, *Eur. Phys. J. E* **2003**, 10, 17–23.
- [3] H. A. Klok, L. Ayres, *Peptide Hybrid Polymers*, Springer, Berlin, **2006**.
- [4] H.G. Börner, *Prog. Polym. Sci.* **2009**, 34, 811–851.
- [5] J. F. Lutz, H.G. Börner, *Prog. Polym. Sci.* **2008**, 33, 1-39.
- [6] B. D. Ulery, L. S. Nair, C. T. Laurencin, *J. Polym. Sci. B. Polym. Phys* **2011**, 49, 832–864.
- [7] L. S. Nair, C. T. Laurencin, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2006**, 102, 47-90.
- [8] S. Agarwal, J. H. Wendorff, A. Greiner, *Polymer* **2008**, 49, 5603–5621.
- [9] W. Lu, J. Sun, X. Jiang, *J. Mater. Chem. B* **2014**, 2, 2369.
- [10] D. L. Leslie-Pelecky, V. D. Labhasetwar, *Biomedical applications of nanotechnology*. (John Wiley, 2007). At http://cataleg.upc.edu/record=b1313825~S1*cat
- [11] H. Tian, Z. Tang, X. Zhuang, X. Chen, X. Jing, *Prog. Polym. Sci.* **2012**, 37, 237–280.
- [12] M.A. Gauthier, H.A. Klok, *Chem. Commun.* **2008**, 23, 2591–2611.
- [13] B. Le Droumaguet, K. Velonia, *Macromol. Rapid. Commun.* **2008**, 29, 1073–1089.
- [14] H.A. Klok, *Macromolecules* **2009**, 42, 7990–8000.
- [15] H. R. Marsden, A. Kros, *Macromol. Biosci.* **2009**, 9, 939–951.
- [16] H. R. Kricheldorf, K. Hauser, *Biomacromolecules* **2001**, 2, 1110–1115.
- [17] J. Liu, C. Zhang, L. Liu, *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, 107, 3275–3279.
- [18] S. Caillol, S. Lecommandoux, A. F. Mingotaud, M. Schappacher, A. Soum, N. Bryson, R. Meyrueix, *Macromolecules* **2003**, 36, 1118–1124.

- [19] J. P. Jain, W. Yeneti Ayen, A. J. Domb, N. Kumar, Chapter 1: Biodegradable Polymers in Drug Delivery, 1–58. *Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development*, Wiley, **2011**.
- [20] B. Lotz, *Adv. Polym. Sci.* **2017**, in press.
- [21] W. Hoogsten, A. R. Postema, A. J. Pennings, G. Ten Brinke, P. Zugenmaier *Macromolecules* **1990**, *23*, 634–642.
- [22] K. Wasanasuk, K. Tashiro, *Macromolecules* **2011**, *44*, 9650–9660.
- [23] K. Wasanasuk, K. Tashiro, *Polymer* **2011**, *52*, 6097–6109.
- [24] J. Puiggali, Y. Ikada, H. Tsuji, L. Cartier, T. Okihara, B. Lotz *Polymer* **2000**, *41*, 8921–8930.
- [25] L. Cartier, T. Okihara, Y. Ikada, H. Tsuji, J. Puiggali, B. Lotz *Polymer* **2000**, *41*, 8909–8919.
- [26] Y. W. Cho, J. Lee, S. C. Lee, K.M. Huh, K. Park, *J. Control. Release* **2004**, *97*, 249–257.
- [27] H. Cao, J. Yao, Z. Shao, *Polym. Int.* **2012**, *61*, 774–779.
- [28] M. S. Kim, K. Dayananda, E. K. Choi, H. J. Park, J. S. Kim, D. S. Lee, *Polymer* **2009**, *50*, 2252–2257.
- [29] M. L. Waters, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 736–741.
- [30] E. Gazit, A possible role for π -stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. *FASEB J.* **2002**, *16*, 77–83.
- [31] M. Reches, E. Gazit, Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes. *Science* **2003**, *300*, 625–627.
- [32] Y. Song, S. R. Challa, C. J. Medforth, Y. Qiu, R. K. Watt, D. Pena, J. E. Miller, F. V. Swol, J. A. Shelnutt, *Chem. Commun.* **2004**, *7*, 1044–1045.
- [33] V. V. Korolkov, S. Allen, C. J. Roberts, S. J. B. Tandler, *Faraday Discuss.* **2013**, *166*, 331–348.
- [34] E. Mayans, G. Ballano, J. Casanovas, A. Díaz, M. M. Pérez-Madrigal, F. Estrany, J. Puiggali, C. Cativiela, C. Alemán, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 16895–16905.
- [35] E. Mayans, J. Casanovas, A. M. Gil, A. I. Jiménez, C. Cativiela, J. Puiggali, C. Alemán, *Langmuir* **2017**, *33*, 4036–4048.
- [36] E. Mayans, G. Ballano, J. Casanovas, L. J. del Valle, M. M. Pérez-Madrigal, F. Estrany, A. I. Jimenez, J. Puiggali, C. Cativiela, C. Alemán, *Soft Matter* **2016**, *12*, 5475–5488.
- [37] E. Mayans, G. Fabregat, R. Juarez, C. Cativiela, J. Puiggali, C. Alemán, *Chem. Select* **2017**, *23*, 1133–1139.
- [38] H. Leuchs, *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1906**, *39*, 857–861.
- [39] F. Fuchs, *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser.)* **1922**, *55*, 2943–2943.
- [40] A. C. Farthing, R. J. W. Reynolds, *Nature* **1950**, *165*, 647–647.
- [41] A. C. Farthing, *J. Chem. Soc.* **1950**, 3213.

- [42] W. H. Daly, D. Poché, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 5859–5862.
- [43] H. Eckert, B. Forster, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1987**, 26, 894–895.
- [44] S. K. Murase, N. Haspel, L. J. del Valle, R. Nussinov, J. Puiggalí, C. Alemán, *RSC Adv.* **2014**, 4, 23231–23241.
- [45] M. Planellas, J. Puiggalí, *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15, 13247–66.
- [46] H. R. Kricheldorf, C. V. Lossow, G. Schwarz, *Macromol. Chem. Phys.* **2005**, 206, 282–290.
- [47] B. Lotz, A. Brack, *Applied Fibre Science* **1979**, 3, 371–410.
- [48] I. C. McNeil, H. A. Leiper, *Polym. Degrad. Stab.* **1985**, 11, 267–285.
- [49] F. D. Kopinke, M. Remmler, K. Mackenzie, M. Möder, O. Wachsen, *Polym. Degrad. Stab.* **1996**, 53, 329–342.
- [50] H. Tsuji, *Polymer* **1995**, 36, 2709–2716.
- [51] H. Tsuji, Y. Tezuka, S. K. Saha, M. Suzuki, S. Itsuno, *Polymer* **2005**, 46, 4917–4927.
- [52] E. W. Woo, H. Ni'mah, Y.-H. Wang, *Ind. Eng. Che. Res.* **2014**, 53, 9772–9780.

VII. CONCLUSIONS

Conclusions

1. Results have evidenced the remarkable control exerted by the characteristics of the solvents mixture, the ionic strength, the substrate and the peptide concentration in the organization of assemblies derived from Phe-derivatives.
2. TFA·FF-OBzl amphiphile organizes in a segregated distribution of hydrophilic and hydrophobic regions. More specifically, the carboxylate (from TFA), amide and ester (both from FF-OBzl) groups form a highly polar core stabilized through hydrogen bonding interactions, which is ringed by a hydrophobic crown involving 10 aromatic rings. This unique organization has enabled us to explain the influence of the solvents mixture properties on the peptide assembly. Thus, the growing of the peptide structure and the exposition of hydrophilic or hydrophobic regions is simply determined by the formation of favorable peptide-solvent interactions at the surface.
3. In polar aqueous environments TFA·FF-OBzl tends to promote the growth of fibers, which coexist with branched-like microstructures when milli-Q water is replaced by 50mM-KCl(aq). Besides, non-polar environments obtained by mixing two organic solvent prefer peptide assemblies organized in plates and spherulites.
4. Tuning the structure of Phe-derivatives by changing the solvents used in the mixture is a very attractive feature to expand the potential utility of peptide assemblies in different fields, for example as molecular carriers and delivery systems.
5. We have successfully synthesized and study the self-assembly of FF-derivatives capped at the N- and C-terminus by azide and alkyne groups, which have been maintained in the *preclick* state. Results prove that despite intermolecular azide···alkyne interactions are significantly weaker than hydrogen bonding in FF and Fmoc···Fmoc π - π interactions in Fmoc-FF-OFm, Poc-FF-N₃ molecules hierarchically aggregate forming

- well-defined supramolecular structures. This has been attributed to the strength of azide...alkyne interactions, which exhibit two components: π - π stacking and π -dipole.
6. The morphology of Poc-FF-N₃ supramolecular structures can be regulated through the peptide concentration, the polarity of the medium and/or the hydrophilicity of substrate. In particular, the formation of stable dendritic-like structures is very striking since, although this kind of branched structures was recently detected in homopeptides with a higher number of phenylalanine residues, they were found to be highly unstable for other FF-derivatives.
 7. The N₃-FF-OPrp peptide exhibits much less tendency to form ordered structures than Poc-FF-N₃ under the same experimental conditions. Indeed, the only supramolecular assembly identified for N₃-FF-OPrp has been observed in very polar environments, in which peptide molecules organize in nanospheres that subsequently aggregate into honeycomb supramolecular structures.
 8. Results obtained from the study of Poc-FF-N₃ and N₃-FF-OPrp reflect that, although the role of the interactions involving alkyne and azide groups is much less decisive than the one played by hydrogen bonds and aromatic π - π stacking interactions, the formers allow modulation of the assembly stabilizing microstructures that are usually unstable.
 9. Three FFFF-based peptides with different flanking groups: FFFF, Fmoc-FFFF and Fmoc-FFFF-OBzl have been synthesized to study the role of the head-to-tail NH₃⁺...⁻ OOC interactions in the assembly of FFFF-derivatives. Thus, these interactions are not possible upon the incorporation of the *N*-Fmoc and C-OBzl protections that promote π - π stacking interactions.
 10. The spontaneous assembly of FFFF peptide results in the formation of tubular nanostructures that resemble those achieved for FF. However, the tubes obtained using the former peptide present many surface irregularities and defects that are not present in the structures derived from FF. DFT calculations indicate that the intrinsic

conformational flexibility of FFFF promotes the formation of irregular nanotubes that pack giving place to such surface defects.

11. The variety of assemblies increases significantly upon the *N*-Fmoc protection of FFFF. The existence of diverse polymorphs suggests that π - π stacking interactions involving Fmoc groups are more versatile, in terms of molecular self-association, than hydrogen bonds. This is consistent with the fact that the former interactions are considerably less specific than the latter ones, which are severely restricted by the relative disposition of N-H and C=O bonds.
12. The detection of three polymorphs in the same sample of Fmoc-FFFF-OBzl has been attributed to the fact that the stability of the different combinations of intermolecular π - π stacking interactions allowed by the Fmoc and OBzl protecting groups and the phenyl side chains are similar. The most noticeable result corresponds to the simultaneous presence of micro-container (or volcano-like) structures, triaxial ellipsoid-like nodules and tubes in samples prepared using a high concentration of peptide in HFIP.
13. A remarkable morphological variability has been observed for FFF, depending on the experimental conditions. Thus, this peptide forms flat plates, laminated helical fibrils, grouped needle-like structures, doughnut-like hollow shapes, micro-bottles (or stacked toroids), individual and grouped chrysanthemum-like structures, and leaves-like dendrimers. Considering that these morphologies were obtained at 4 °C and the low volatility of the solvents mixtures at such temperature, they are expected to be thermodynamically stable.
14. The mechanisms proposed for the formation of FFF supramolecular structures reflect how structural nucleation and hierarchical growing are controlled through the balance between peptide···peptide and peptide···solvent interactions, which in turn are regulated by the peptide concentration and the polarity of the solvent mixture used to dissolve the peptide, respectively.

15. The capacity of FFF to assemble in very diverse supramolecular structures is greater to that exhibited by its homologues with an even number of Phe residues (*i.e.* FF and FFFF). This unique behavior is of enormous interest from a technological perspective because different applications can be proposed using a single peptide sequence and regulating parameters such as the concentration and the environmental polarity.
16. The spontaneous formation of a large number of stable polymorphic structures for Fmoc-FF-OFm, Fmoc-FFF-OFm and Fmoc-FFFF-Fmoc has been proved. Depending on the solvent:co-solvent conditions, peptide concentration and temperature, molecules can organize into stacked braids, doughnuts-like, bundled arrays of nanotubes, corkscrew-like and/or spherulitic microstructures.
17. In addition to the above mentioned organizations structures, Fmoc-FF-OFm, Fmoc-FFF-OFm and Fmoc-FFFF-Fmoc exhibit some ability to assemble into dendritic assemblies of various sizes. Although the dendritic structures formed by Fmoc-FF-OFm and Fmoc-FFF-OFm were unstable, very stable well-defined dendritic structures were derived from 0.5-2 mg/mL Fmoc-FFFF-OFm solutions in 1:4 HFIP:EtOH at room temperature.
18. Fmoc-FFFF-OFm dendritic structures consisted of a central framework with 4-fold pseudo-symmetry that grows forming highly branched structures. Fractal dimension analyses revealed not only self-similarity but also that the dendritic assembly occurs through a diffusion limited aggregation mechanism onto a plane (*i.e.* the surface substrate). These dendritic structures should be considered as powerful building blocks for the fabrication of complex and relatively infrequent structures.
19. Theoretical calculations indicate that Phe-homopeptides capped with two fluorenyl functionalities adopt an antiparallel arrangement stabilized by intermolecular hydrogen bonds and π - π interactions. Such stability increases with the length of the Phe-segment.
20. Fmoc-FFF-OFm is able to adopt a large variety of self-assembled microstructures by controlling the substrate. Results indicate that in a first stage, which probably occurs in solution, highly hydrophobic Phe-based peptides tend to organize forming nanofibers.

After this, the hierarchical assembly of such nanofibers is profoundly affected by the roughness and, specially, the degree of hydrophilicity / hydrophobicity of the substrate.

21. Peptide···peptide interactions (controlled by the peptide concentration), peptide···surface interactions (controlled by the hydrophobicity / hydrophilicity of the surface) and the surface roughness are crucial factors for defining the shape, dimensions and stability of the hierarchical assemblies.
22. Favorable peptide···surface provided by hydrophobic surfaces tend to prevent the formation of supramolecular structures, whereas the unfavorable interactions induced by hydrophilic surfaces enhance the role of peptide···peptide, promoting the hierarchical formation of supramolecular assemblies. In addition, the formation of organized assemblies is also precluded in surfaces with very high surface roughness.
23. The wide range of available surfaces offers a valuable tool for the development of bionanotechnological applications based on hierarchical peptide assemblies. However, the ability of plasma treated polystyrene for stabilizing well-defined dendritic structures has been found to be particularly striking.
24. The use of phenylalanine macroinitiators for the ring opening polymerization of lactide has been revealed effective to get diblock copolymers. The size of the peptide and the polylactide blocks can be well controlled through the monomer/initiator ratio used in the two polymerization steps: the ROP of Phe-NCA using butylamine as initiator and the ROP of lactide using the macroinitiator.
25. Crystallization from the melt of polyphenylalanine/polylactide conjugates was characterized by a high nucleation that could be avoided by inducing a phase separation through an annealing process. Melt crystallization gave rise to spherulites with a distinctive lamellar disposition (i.e. flat-on or edge-on) and birefringence (i.e. negative or positive) in function of the length of the PPhe block.

26. Crystallization of polyphenylalanine/polylactide conjugates from diluted solutions opened a wide variety of possibilities (control of temperature, concentration, solvent and precipitant agent) that led to a great diversity of crystalline morphologies. The most usual ones corresponded to single crystals and spherulites typically observed with PLLA, but also morphologies previously reported in the self-assembling studies of phenylalanine could be observed.

ANNEX A:

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Nanoestructuras peptídicas autoorganizadas

Un trabajo pionero en la autoorganización de oligopéptidos fue el descubrimiento realizado por Reches y Gazit, donde se manifiesta la formación inmediata de nanotubos al precipitar una solución del dipéptido difenilalanina (FF, donde F = L-Phe) con un exceso de agua^[1]. Desde entonces, se han llevado a cabo grandes esfuerzos por desarrollar biomateriales basados en la autoorganización de péptidos aromáticos. Éstos ya se han empezado a considerar una nueva clase de materiales debido a su sencillez estructural y versatilidad funcional, su bajo coste y su gran cantidad de aplicaciones. La autoorganización se define como un proceso espontáneo en el cual las moléculas se agregan a través de un proceso de reconocimiento molecular para formar estructuras ordenadas. El modelo clásico de cristalización considera el crecimiento cristalino como un proceso de amplificación en que núcleos estables son simplemente ampliados por la replicación de las celdillas unidad, sin incurrir en cambios estructurales en la superficie. Contrariamente, el crecimiento de cristales mediante la agregación de *building blocks* preformados es un proceso de montaje a mesoescala que resulta en cristales únicos con texturas de mosaico isoorientadas. Este proceso puede ocurrir a través de la coalescencia de nanopartículas primarias en agregados coloidales, a menudo de tamaño uniforme, y su posterior reestructuración interna para producir una partícula cristalográficamente continua.

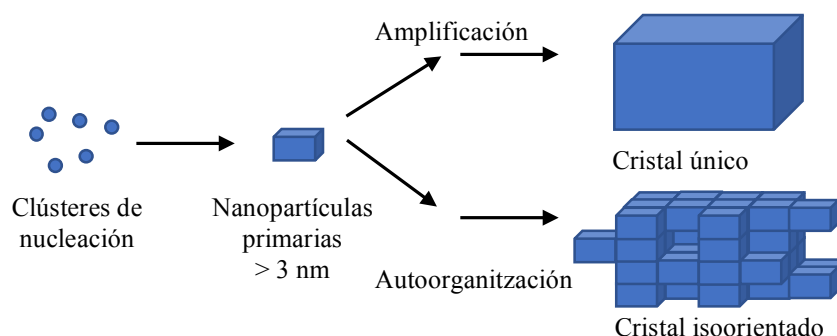


Figura 1. Mecanismos alternativos de crecimiento de cristales únicos.
Adaptado de la Ref. [2] con la autorización de Wiley.

Los mecanismos para la formación de estructuras autoorganizadas, como son los nanotubos y nanoestructuras, se atribuyen a fuerzas hidrofóbicas y de apilamiento π entre los anillos aromáticos en un medio líquido y polar como el agua. En esta tesis se ha considerado el entorno que rodea a la especie en cuestión y se estudiará dicho medio a partir de sus propiedades físicas (constante dieléctrica, fuerza iónica, rugosidad) y químicas (interacciones aromáticas, formación de puentes de hidrógeno, afinidad química, polaridad). Esta tesis intentará ilustrar las características de autoorganización de materiales basados en *building blocs* de oligofenilalanina, así como evaluar su proceso de interacción con una superficie, que puede presentar unas determinadas propiedades bien diferenciadas del seno de la solución.

1.2. Aplicaciones y ventajas de los materiales autoorganizados basados en oligopéptidos

Las estructuras autoorganizadas, como los nanotubos y nanofibras de FF, y en general de oligopéptidos, son nanomateriales con un gran abanico de aplicaciones potenciales. Los materiales estructurados en la nanoescala, como las proteínas y péptidos, están siendo empleados como *building blocks* en biomateriales,^[3] materiales inteligentes que ofrecen respuesta a estímulos externos,^{[4],[5]} medicina regenerativa,^[6] administración de fármacos,^[7] terapia génica,^[5] o en aplicaciones nanotecnológicas.^[8] La estructura y el proceso de autoorganización son temas de alto impacto en la fabricación de materiales supramoleculares, pero la naturaleza biológica de los materiales es la clave para la biocompatibilidad. Los materiales basados en proteínas y oligopéptidos pueden ser utilizados en la fabricación a gran escala de vendajes, inventos médicos que permiten la lenta desorción de fármacos u otros materiales biodegradables de uso médico.^[9] Entre éstos, los péptidos aromáticos están ganando terreno en la fabricación *bottom-up* de nanomateriales. La geometría plana de los residuos aromáticos y las restricciones debidas a su apilamiento marcan la autoorganización de los péptidos aromáticos anfífilos. El diseño de las nanoestructuras puede ser racionalizado a partir de los apilamientos moleculares aromáticos que pueden adoptar y en la propensión de la cadena principal peptídica en formar láminas β . Así, en general, los posibles empaquetamientos aromáticos que pueden adoptar éstos péptidos son los apilamientos paralelos, antiparalelos y el apilamiento intercalado antiparalelo.^[10]

Estructuralmente, las fibras compuestas de *building blocks* basados en péptidos estructurados en láminas β o fragmentos β -amiloideos ofrecen diversas ventajas como poder controlar su nivel de organización, tener una resistencia excepcional a condiciones extremas (temperatura, agentes desnaturizantes, etc.) y ofrecer la posibilidad de introducir cambios a nivel de secuencia con tal de obtener diferentes funcionalidades. Así, los fragmentos β pueden ser usados en el diseño racional de nanoobjetos artificiales y nanodispositivos.^[11]

Paralelamente, los nanocristales tubulares de FF han estado extensamente explorados en nanociencia ya que ofrecen unas propiedades únicas: una alta estabilidad mecánica y térmica, intrínseca piezo- y ferroelectricidad intrínseca, y la posibilidad de modificar su morfología a través del control de las condiciones externas, o mediante funcionalizaciones químicas.^[12] En la Tabla 1 se enumeran las aplicaciones más relevantes que actualmente se proponen para las nanoestructuras de FF.

Tabla 1. Principales aplicaciones de las nanoestructuras.

Objeto	Campo de estudio	Aplicación	Referencia
Octapéptidos (lámina β)	Biología	Canales de iones transmembrana, agentes citotóxicos, administración de fármacos	[13], [14]
FF, péptidos		Biológicas, biomateriales	[15]
FF			[16], [17]
FF	"	Transporte y administración de fármacos	[18–20]
Fmoc-FF	"	Cultivos celulares	[21–23]
Fmoc-FF y péptidos,	"	Medicina regenerativa, terapias	[24]
Tripéptidos de FF	"	Emulsificantes	[25]
Derivados de FF y FFFF con Gd	"	Agentes de contraste en IRM	[26]
Derivado de FF	Nanotecnología		[27]
FF, péptidos	"	Nanodispositivos	[28], [29]
FF	Electroquímica	Biosensores	[30], [31]
FF	"	Transistores de efecto de campo	[32]
FF y derivados FF	"	Fabricación de sensores ultrasensibles y selectivos	[33]
FF	"	Detección selectiva de neurotoxinas	[34]
FF	"	Baterías y supercondensadores	[35–37]
FF	"	Piezoelectrónicos y ferroelectrónicos	[38–41]
Derivados de FF, Ciclo-FF	Fotoelectrónica		[42]
Ciclo-FF	Fotoelectrónica		[43–45]
Derivados amiloideos de FF	"	Celdas solares	[46], [47]
FF	"	Celdas solares	[48]
FF + porfirina	"	Fotosíntesis biomimética	[49]
FF	Óptica		[50–52]
FF	"	Inmovilización de puntos cuánticos	[53]
Boc-FF, Boc-FFF	Microfluidica	Impresión <i>jet</i>	[54], [55]
FF	Catálisis	Catálisis heterogénea con Pd en condiciones acuosas	[56]

Finalmente, es necesario introducir las estructuras basadas en conjugados peptídicos de copolímeros de bloque, que formulan una nueva categoría dentro los péptidos anfífilos.^[57] Modificar un péptido con un segmento de polímero puede suponer introducir todo un abanico de propiedades al huésped, que retendrá las características biológicas de autoagregación. Las propiedades de los conjugados de péptido-polímero abastecen desde la bioactividad del fragmento peptídico (controlando la secuencia de aminoácidos), a las propiedades físicas que introduce el bloque de polímero, incorporando, por ejemplo, comportamientos de respuesta a estímulos externos, una estabilidad térmica incrementada y un tiempo de vida media superior.^[58]

1.3. Introducción a la estructura y propiedades de oligopéptidos de fenilalanina y conjugados de polímero sintético

1.3.1. La difenilalanina, FF

La estructura cristalina de la FF ha sido conseguida por Görbitz,^[59-61] quien describe la FF cristalizada en cadenas β paralelas enlazadas cabeza-cola por puentes de hidrógeno, formando canales hidrofílicos de 10 Å alojados dentro la matriz hidrofóbica de los residuos aromáticos de fenilalanina (Figura 2).

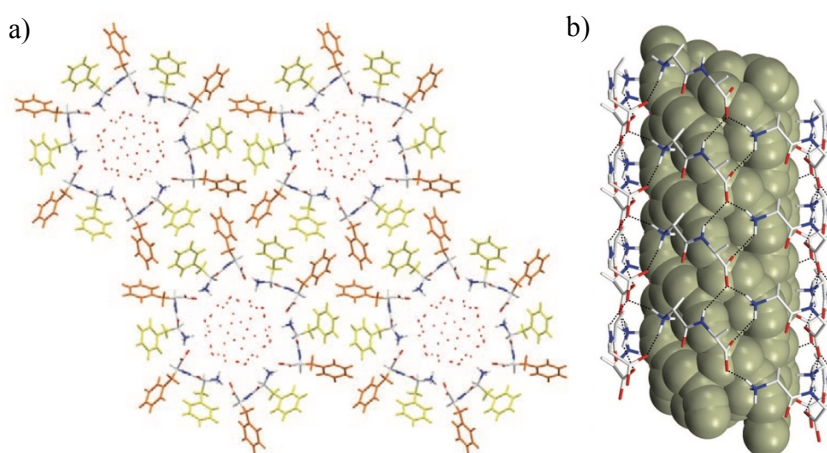


Figura 2. La celda unidad y el empaquetamiento molecular de la FF visto desde el eje cristalográfico *c*. (a) Las esferas representan las moléculas de agua. (b) Visión del canal hidrofílico de FF representado por la superficie de van der Waals de las moléculas de agua. Los residuos aromáticos se han omitido para mayor claridad. Las líneas punteadas representan los puentes de hidrógeno. Nótese que ningún enlace C=O acepta átomos de hidrógeno. Adaptado y reimpresso de la Ref. [61] con la autorización de Wiley.

Los nanotubos de FF cristalizados en agua están formados por una red de puentes de hidrógeno entre los dipéptidos y las moléculas de agua que, a su vez, sustentan los canales hidrofílicos de la capa del nanotubo. La agregación de hexágonos cara a cara y su autoorganización en los extremos produce la estructura jerarquizada microtubular hexagonal final.^[62]

Desde hace tiempo, es conocido que el solvente afecta a la conformación que adoptan los péptidos.^[63] Recientemente, se ha observado que los nanotubos de FF cristalizados en agua se disuelven en un ambiente orgánico polar como el metanol, destruyendo la red de puentes de hidrógeno.^[12] Este proceso es reversible, de forma que en solución acuosa se puede rehacer dicha red y formar estructuras hidratadas como los nanotubos. El proceso es relevante y se ha entendido como un gran progreso en materiales biológicos.^[64]

A partir de soluciones de MeOH saturadas, se han recogido monocristales con una estructura diferente a la del agua. La nueva estructura solvatomórfica (FF-MeOH) tiene una celda unidad

romboédrica, en vez de hexagonal como la del agua. Asimismo, los enlaces peptídicos quedan escondidos y se exponen las cadenas laterales aromáticas hacia el solvente (Figura 3a). No obstante, las dimensiones de la celda unidad son similares y los enlaces peptídicos también forman cadenas orientadas paralelamente al eje largo del cristal, aunque aquí se disponen en *herringbone* (Figura 3b).^[12]

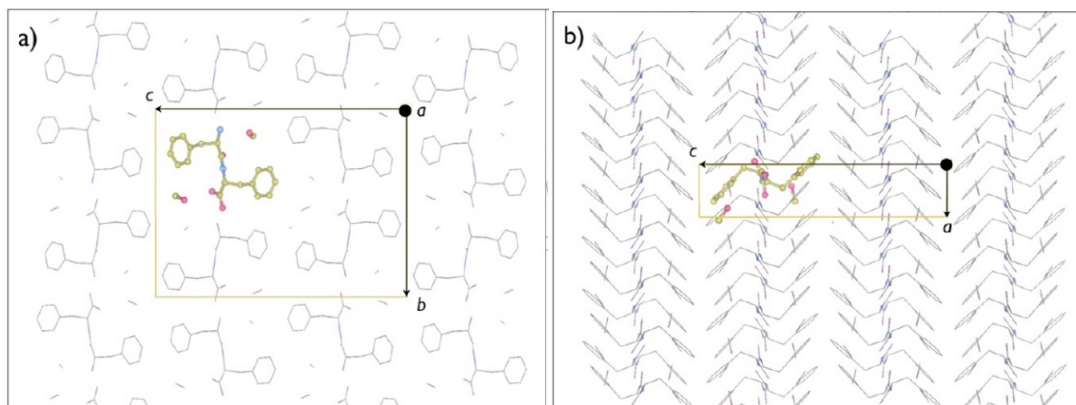


Figura 3. Celda unidad y empaquetamiento molecular de las estructuras FF-MeOH vistas desde (a) el eje *a* y (b) el eje *b*. La orientación de la estructura FF-MeOH es tal que el eje *a* se alinea con la dimensión más larga de la aguja cristalina. Adaptado y reimpresso de la Ref. [12] con la autorización de The American Chemical Society.

La FF produce otras estructuras polimórficas usando otros disolventes en la preparación. Por ejemplo, se han obtenido microcristales con EtOH (lámina β paralela), o organogeles con tolueno^[65] (lámina β antiparalela) y ⁱPrOH.^[66] Este dipéptido se muestra muy sensible a pequeñas trazas de solvente con capacidad para formar puentes de hidrógeno. Por ejemplo, se obtienen microcristales en CH₂Cl₂ puro, mientras que se forma un organogel fibroso si éste contiene pequeñas cantidades de algún solvente que establece puentes de hidrógeno (EtOH, acetona o DMF).^[67]

Asimismo, las condiciones de evaporación como la humedad relativa,^[68] el medio acuoso como la fuerza iónica o el pH,^[69] así como el sustrato,^[70] afectan en gran medida a la calidad y la morfología resultante. Este hecho se hace patente debido a la gran cantidad de nanoestructuras identificadas^[71] y calculadas.^[72]

1.3.2. Fmoc-FF

El derivado más estudiado del dipéptido difenilalanina es el derivado 9-fluorenilmetiloxycarbonil, Fmoc-FF. Mahler, Gazit y colaboradores ya descubrieron que Fmoc-FF forma un hidrogel rígido ($G' = 20$ kPa) y ópticamente transparente autoorganizándose en fibras de 10-100 nm de diámetro al ser precipitado con un exceso de agua desde una solución de HFIP concentrada (Figura 4A).^[73]

La formación de fibras en vez de nanotubos se atribuye al empaquetamiento del grupo Fmoc y al incremento de las interacciones π - π durante la autoorganización. Los autores asignan las bandas a 1607, 1658 i 1691 cm^{-1} en el FTIR a conformaciones de lámina β i giro β . Los hidrogeles de Fmoc-FF exhiben una baja citotoxicidad y demuestran ser un medio de soporte para el crecimiento de células de ovario de hámster chino.

Simultáneamente (2006), Ulijn y colaboradores presentaban estudios sobre los hidrogeles de Fmoc-FF formados al acidificar con HCl una solución básica del dipéptido (20 mM) hasta pH neutro. Los autores investigaron la estructura molecular por medio de diferentes técnicas. A partir de fluorescencia, se observó que podía tratarse de una superposición de grupos Fmoc apilados de forma antiparalela y adicionalmente, la aparición de un pico a 1685 cm^{-1} en el FTIR es consistente con un empaquetamiento antiparalelo de las cadenas principales (Figura 4B1). Además, la señal de CD es indicativa de interacciones π - π de los grupos fluorenil y la formación de estructuras super-helicoidales.^[22]

En otro de sus estudios, los autores profundizan indicando que los grupos fluorenil se encuentran demasiado lejos para formar interacciones π - π en una lámina β antiparalela. Aquí, se propone un modelo basado en el apilamiento escalonado de los péptidos intercalando los grupos fluorenil entre sí. Además, debido a la torsión presente en las propias láminas β , la segunda lámina rota en relación a la primera, de manera que los grupos fluorenil interactúan a lo largo de toda su longitud. Un total de 4 láminas β crean la sección de un cilindro, dónde los fluorenilos están apilados a pares, entre los grupos fenil, encima y por debajo de éstos, creando un agregado *J*. La estructura general cilíndrica tiene una anchura de 30 Å, con 28 monómeros por turno, y con un canal en el centro de 7 Å de diámetro (Figura 4B). A partir de las imágenes de TEM y WAXS, se observó que las fibras estudiadas se componen de un empaquetamiento de dos fibras vacías de 2.5-3 nm de diámetro. La sección transversal de cada una de las fibrillas cilíndricas correspondería a cuatro láminas β dispuestas en las aristas de un cuadrado y encaradas en pares. Estas láminas β estarían estabilizadas por el apilamiento π - π antiparalelo de los grupos Fmoc y las fibrillas se unirían de lado dando lugar a las cintas planas que se observan al TEM.^[74]

Ulijn observó que, al valorar la solución de Fmoc-FF a pH = 10.5 con HCl, se producen dos transiciones ácidas desplazadas respecto a un ácido débil ($pK_a \sim 10$ y ~ 6). Estas dos transiciones parecen ser debidas a transformaciones estructurales durante el proceso de autoorganización. Se observa que, por debajo del aparente pK_{a1} , se forman las fibras compuestas de láminas β antiparalelas, que coinciden con la aparición del hidrogel débil ($G' = 10$ Pa). Por debajo del pK_{a2} , las fibras se agregarían lateralmente, dando lugar a cintas más largas ($d > 100$ nm) y produciéndose finalmente la precipitación macroscópica (Figura 4C).^[75]

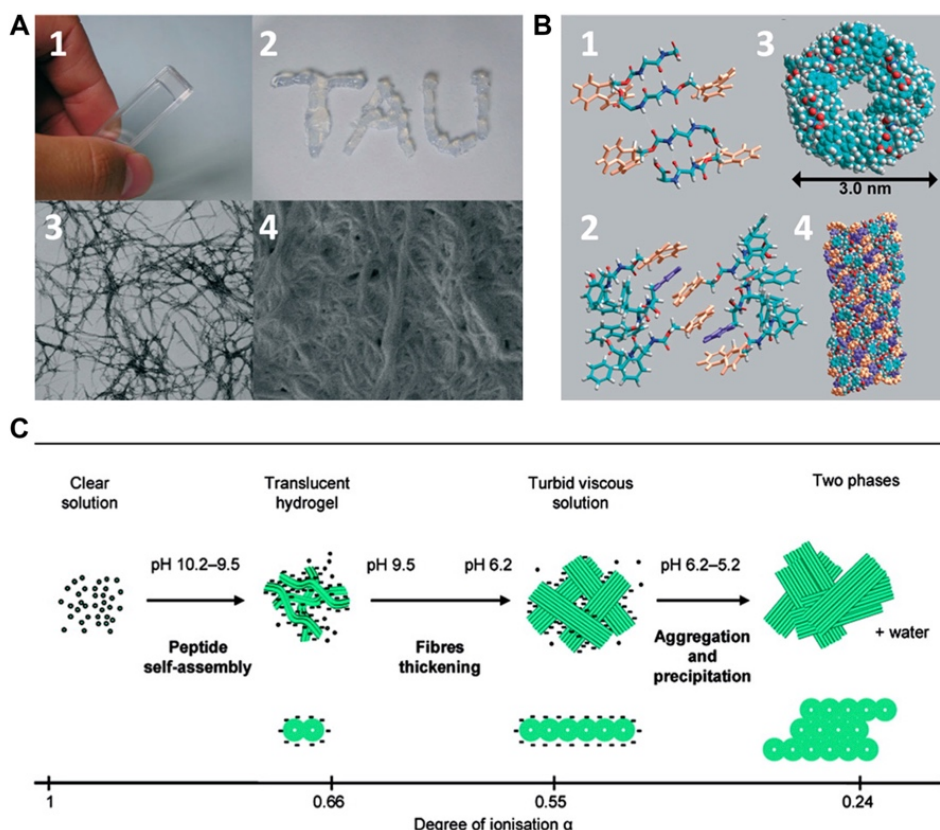


Figure 4. A) Imágenes a escala macroscópica y microscópica del gel obtenido para el dipéptido Fmoc-FF. A1) Fmoc-FF se organiza en un hidrogel autosoportado como se puede observar para el método de la cubeta invertida. A2) El gel se puede inyectar a través de una jeringa sin perder la estructura. A3) Imágenes TEM revelan una red fibrosa. A4) Imagen HR-SEM de la matriz gelatinosa. B) Modelo de mínima energía para la disposición molecular de Fmoc-FF en el estado gel usando un campo de fuerza AMBER. Los grupos Fmoc se representan en naranja y los grupos fenil en violeta. B1) Cadenas de Fmoc-FF dispuestas en un modelo de lámina β antiparalelo. B2) Apilamientos π formados al encajar pares de grupos Fmoc alternando láminas β . B3) vista superior y B4) vista lateral de la estructura cilíndrica formada para la autoorganización de monómeros de Fmoc-FF. C) Mecanismo propuesto para la autoorganización de Fmoc-FF desde un pH alto a un pH bajo, en función del grado de ionización. Reimpreso de la Ref. [76] con la autorización de Elsevier.

En la literatura existen diferentes métodos para obtener estos geles, pero los más estudiados son los producidos por un cambio de solvente (Mahler, Gazit) o un cambio de pH (Uljin). No obstante, a pesar de la gran variabilidad en las propiedades mecánicas descritas, las características de los hidrogeles de Fmoc-FF muestran estar fuertemente gobernadas por el pH, dejando a un lado el método usado. Los geles con G' más alta son los obtenidos con un método de cambio de solvente. Sin embargo, el pH final de éstos tiende a ser 4, lo que les hace inservibles para aplicaciones biológicas. Se pueden obtener geles con tampones salinos a pH fisiológico, pero sus propiedades varían notablemente según el tampón escogido y siendo el pH final el principal determinante de la rigidez de los geles.^[77] De acuerdo con los resultados de Liebmann y colaboradores,^[21] un segundo factor relevante es la proporción en volumen del disolvente del péptido. Tal y como se puede apreciar en estos estudios, al incrementar la relación de DMSO:agua, Φ_{DMSO} , de 0.05 a

0.25, G' aumenta hasta a un máximo de 24kPa (pH 4). La habilidad de un gel para recuperarse después de un esfuerzo de cizalla (G'_{post}/G'_{pre}) se asocia a la percolación de las partículas de gel después del esfuerzo y también es dependiente de Φ_{DMSO} . Similar al comportamiento de G' , las fracciones bajas de Φ_{DMSO} (0.05-0.35) son las que se recuperan más del 80%.

Imágenes confocales a fracciones bajas de Φ_{DMSO} muestran una microestructura esferulítica, especialmente a 0.05, pero que persisten a más altas Φ_{DMSO} (0.5), donde el factor de recuperación es bajo. Esta relación estructura/propiedad ya ha sido identificada como un factor clave en la obtención de hidrogeles con buenas propiedades de recuperación frente a un esfuerzo. La gran hidrofobicidad de Fmoc-FF resulta en la nucleación y crecimiento (formación de dominios esferulíticos) en un ancho rango de Φ_{DMSO} . En cambio, la microestructura de los geles obtenidos en una solución acuosa por cambio de pH es una red uniforme de fibrillas finas, con el consecuente crecimiento de las fibras en grosor a pH más bajo. De forma análoga, para el dipéptido Fmoc-LG, la formación de una red uniforme se identifica con geles que no se recuperan después de un esfuerzo de acuerdo con un proceso de descomposición espinodal, donde, a partir de un cierto esfuerzo, las uniones se rompen y no se recuperan.^[78]

Ya que Φ_{DMSO} y la microestructura son factores clave en las propiedades del gel, Adams y colaboradores utilizan diferentes solventes para preparar los geles (DMSO, HFIP, Acetona y EtOH), observando que las propiedades reológicas varían notablemente con la selección del solvente. Los geles obtenidos con acetona son metaestables y precipitan en forma de cristalitas útiles para XRD. Estos cristales muestran Fmoc-FF apilado de forma paralela en cuatro pilas a lo largo del eje cristalográfico b , formando una estructura cristalina refinada como el grupo quiral monoclinico C2 (Figura 5). Contrariamente, los geles obtenidos con EtOH como solvente orgánico parecen ser los más homogéneos en cuanto a distribución a microescala, presentando una red uniforme de fibrillas entrelazadas.

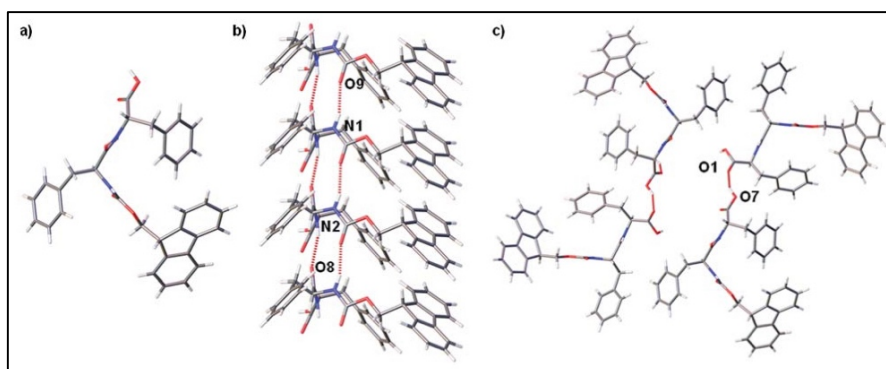


Figura 5. Estructura del cristal de Fmoc-FF·(H₂O)_{0.875}. A) Vista en perspectiva [010], B) mostrando cuatro moléculas de Fmoc-FF apiladas a lo largo del eje cristalográfico b asociadas a partir de puentes de hidrogeno. C) Empaquetamiento molecular cristalino de cuatro apilamientos paralelos de moléculas de Fmoc-FF centradas alrededor de un eje de rotación de 180°, vista en perspectiva [010]. Las interacciones de enlace a hidrogeno se muestran como líneas punteadas, el agua de difusión se ha omitido para mayor claridad. Reimpreso de la Ref. [79] con la autorización de The Royal Society of Chemistry.

Sorprendentemente, las dimensiones de las fibras obtenidas con los diferentes solventes son muy parecidas entre sí al ser medidas por SANS, pero la morfología de la red de fibras resultante es controlada por el solvente empleado (Figura 6). Los geles obtenidos con EtOH a $\Phi_{\text{DMSO}} 0.3$ son los más fuertes, pero tienen poca recuperación tras un esfuerzo. En cambio, los geles con DMSO o HFIP son fuertes, además de recuperarse un 95-100% al detener el esfuerzo. Esto se atribuye a una microestructura donde dominios de fibras en disposición esferulítica están interconectados por una fase fibrosa menos densa. Al incidir un esfuerzo, las uniones se rompen, pero no los dominios. Y al detener el esfuerzo, los dominios se pueden reestructurar y formar nuevamente una red. Además, ya que muchas aplicaciones son incompatibles con un solvente orgánico, los autores muestran la posibilidad de retirar este solvente sin alterar las propiedades del hidrogel.^[79]

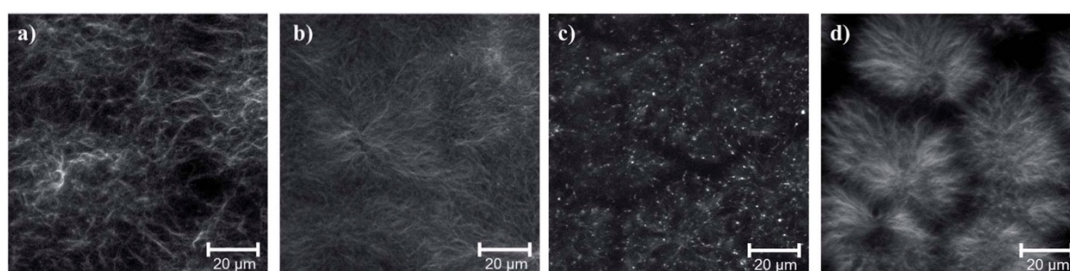


Figura 6. Imágenes de microscopía confocal 24 horas después de la preparación de los geles de Fmoc-FF a $\Phi_{\text{solvente}} = 0.3$ utilizando a) DMSO b) EtOH c) Acetona d) HFIP. Los geles se han teñido con Azul Nilo. Reimpreso de la Ref. [79] con la autorización de The Royal Society of Chemistry.

En un artículo reciente, Dudukovic y Zukoski observan la transición a gel al añadir agua a una solución del dipéptido en DMSO.^[80] La solución pasa rápidamente (<1 s) a un estado de no equilibrio, dando lugar a esferas de ~ 2 μm que dan una consistencia opaca, seguido de la formación de fibras de 5-10 nm (<5 min) que dan lugar al gel transparente. Estas fibras vienen de la nucleación en un número limitado de esferas y se expanden hacia el seno de la solución, mientras que el resto de esferas se ve atraída hacia las fibras y se disuelven expandiendo la red. Estas observaciones indican que la estructura fibrosa representa un mínimo en la energía libre. A tiempos más largos (>30 min), las fibras continúan evolucionando hasta que toda la red pasa a ser uniforme y estable por un tiempo infinito (años). Esta reestructuración lenta ocurre mientras las moléculas se redisuelven y reordenan, extendiéndose y creando nuevas ramificaciones y uniones entre los clústeres fibrosos.

El incremento espontáneo del área superficial durante el proceso de crecimiento y maduración es una evidencia que, al aumentar las fuerzas atractivas, no resulta en una descomposición espinodal o cristalización. Como ha descrito Zaccarelli, la formación de estructuras elongadas y uniformemente distribuidas se puede entender como la formación de estructuras extendidas, en equilibrio, que relajan lentamente, compuestas de partículas irregulares que experimentan un

número bajo de interacciones o uniones a bajas temperaturas. La difusión lenta de las partículas entre las estructuras ramificadas resulta en tiempos de relajación largos, típicos de los geles. En los geles de Fmoc-FF obtenidos por el método de cambio de pH (Ulijn), el dipéptido se estructura en un modelo antiparalelo de láminas β , creando una fibra de 3 nm. En este modelo, una molécula de Fmoc-FF tendría un número de coordinación 3:1 por la formación de una lámina β + 2 por el apilamiento π - π del grupo Fmoc con una molécula encima y otra por debajo.

Además, éstos geles son termorreversibles, tienen la capacidad de formar nuevamente una red dinámica de fibras al enfriar después de la fusión (>85 °C). Todo esto se interpreta, juntamente con las propiedades mecánicas y de recuperación después de un esfuerzo de cizalla, como un gel coloidal en equilibrio compuesto de partículas con valencia limitada, en vez de un gel en el que intervienen fuerzas repulsivas de largo alcance (apantallamiento electrostático).

1.3.3. Homooligofenilalaninas monodispersas y derivados

La trifenilalanina, FFF

El estado de conocimiento sobre el tripéptido FFF en el contexto de estudio de esta tesis es escaso. No obstante, consideramos que es de gran interés por ser el primer homólogo en la serie de homooligofenilalaninas. El primer estudio teórico realizado con una secuencia del tripéptido aromático data de 1989, y en él se estudiaron las preferencias conformacionales y las interacciones locales del derivado *N*-acetil-*N'*-metilamida del tripéptido FFF.^[81] Los autores concluyen que la conformación extendida es la de más baja energía y que las interacciones inter-residuales tienen poco efecto en la distancia media cuadrática cola-cola. Asimismo, este trabajo recoge las primeras investigaciones (1976-9) de C. Toniolo y colaboradores sobre la estructura tanto en solución como en fase sólida de homooligofenilalaninas ($n=2-7$) diprotegidas. Utilizando las técnicas de absorción en IR, DC y dispersión de Raman, exponen que los oligopéptidos de fenilalanina adoptan conformaciones sin plegar en solución y estructuras β en fase sólida.

Más concretamente, los primeros estudios sobre el tripéptido H-FFF-OH desprotegido (2008-9) son los realizados, precisamente, por el equipo de G. Archontis y E. Gazit, y P. Tamamis y L. Adler-Abramovich.^[82,83] En éstos, se investigan las características de autoagregación de dos soluciones acuosas de cadenas peptídicas, 12 FF y 8 FFF respectivamente, con los extremos ionizados (OOC^- y NH_3^+), usando simulaciones en DM con el modelo GBSW *replica-exchange* con solvente implícito. En las dos soluciones de péptido, los monómeros frecuentemente se alinean con otros, formando redes lineales estabilizadas por interacciones de puente de hidrogeno de cabeza (NH_3^+) a cola (OOC^-) intermoleculares y del residuo aromático. Los extremos de estas cintas de péptidos a menudo se tocan o son próximos, formando agregados elipsoidales abiertos o en forma de anillo (Figura 7).^[82]

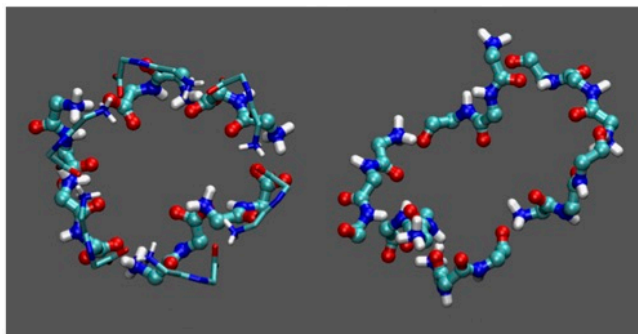


Figura 7. Representación de las redes en forma de anillo compuestas por 6 péptidos de FF (izquierda) o FFF (derecha) en las simulaciones a 300 K. Sólo los átomos de la cadena principal de las redes se muestran en representación de bolas. Los otros átomos de la red y del agregado circundante se han omitido. Por comparación, el anillo hexagonal de los cristales de FF (en barras finas) se superpone contra el anillo de simulación. Reimpreso de la Ref. [83] con la autorización de The Biophysical Society.

Estas interacciones son más pronunciadas en el tripéptido FFF que en FF, de acuerdo con una mayor frecuencia de formación de redes interpeptídicas y con una mayor estabilidad de los agregados en el rango de temperatura estudiado (288-416 K), aunque es capaz de difundirse y reorganizarse.^[83]

En segundo término, al analizar el contenido de estructura secundaria en los agregados de FF o FFF con un módulo STRIDE de VMD, se observa que el péptido se puede organizar por pares, o, con menor frecuencia, en tríos de cadenas –monómeros- en láminas β . Prácticamente el 100% de las láminas son antiparalelas, con excepción de las láminas de tríos de FFF, que son mixtas. En éstas, la orientación antiparalela no es la preferida termodinámicamente y, por ejemplo, el péptido puede formar anillos superpuestos a lo largo del canal interno, como en el caso de los cristales de FF en paralelo. En los cristales de FF, el dipéptido tiene dos residuos aromáticos del mismo lado respecto el enlace peptídico. De esta manera, los residuos laterales se encaran hacia el exterior de los anillos en orientación “forma de T”. En el caso de la FFF de las simulaciones, los residuos aromáticos son un 51% ‘forma de T’ y pueden encontrarse en el interior del anillo del agregado, sin interferir en las interacciones cabeza a cola (debido a la mayor longitud del péptido). Esta diferencia respecto a la FF puede marcar un comportamiento excepcional en la autoorganización en nanoestructuras.

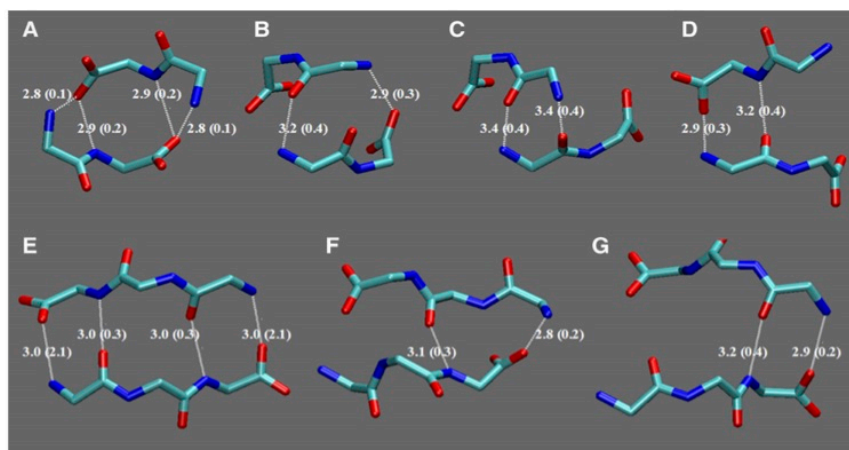


Figura 8. Patrones de enlace de hidrógeno más importantes de las estructuras en lámina β formadas por dos cadenas de FF (parte superior) y FFF (parte inferior) en las simulaciones a 300 K. Sólo los átomos pesados de la cadena principal de las estructuras se muestran en la representación. Se dan los valores de las distancias medias y de las desviaciones estándar (en entre paréntesis). Reimpreso de la Ref. [83] con la autorización de The Biophysical Society.

Recientemente, se han realizado cálculos con el péptido Ac-FFF-NH₂ con DFT-D, que muestran que el péptido se pliega de manera que crea regiones hidrofóbicas o microbolsillos al interactuar con los grupos laterales aromáticos.^[84]

Con el objetivo de revelar las diferencias de comportamiento entre el mecanismo de autoagregación de FF y FFF, se han realizado simulaciones en MD “*coarse-grained*” con un campo de fuerza clásico, duraciones de 900-6000 ns a concentraciones de 120, 80 y 45 mg/mL de FFF, y, análogamente, con FF.^[85] Se analizan las trayectorias de las MD utilizando diferentes parámetros: área superficial accesible al solvente (SASA), radio de giro R_g , radio de giro respecto al eje X,Y y Z ($R_gX...$), la energía libre superficial 2D, la función de distribución de las cadenas centrales de péptido y la de los residuos laterales y la distribución de probabilidad en tamaño de las láminas β .

A partir de múltiples simulaciones desde el estado desordenado, inicialmente se observa que los péptidos de FFF se organizan en nanoestructuras sólidas, prácticamente llenas, y que pueden ser nanoesféricas o nanocilíndricas (22x10 nm) (Figura 9). El proceso de formación de nanoestructuras de FFF se inicia con la fusión de múltiples clústeres (3 ns) que, con el tiempo, se funden en un agregado, esférico o alargado respectivamente (90-120 ns). La reorganización de las cadenas de péptido en la dirección z acaba formando un agregado cilíndrico alargado (180 ns), que es el paso anterior al nanocilindro estable (600 ns), o si, por otro lado, esta reordenación es esférica, acaba dando una nanoesfera (600 ns). En ambos casos, durante el proceso de reordenación el área accesible SASA se ve minimizada y se optimizan las interacciones interpeptídicas.

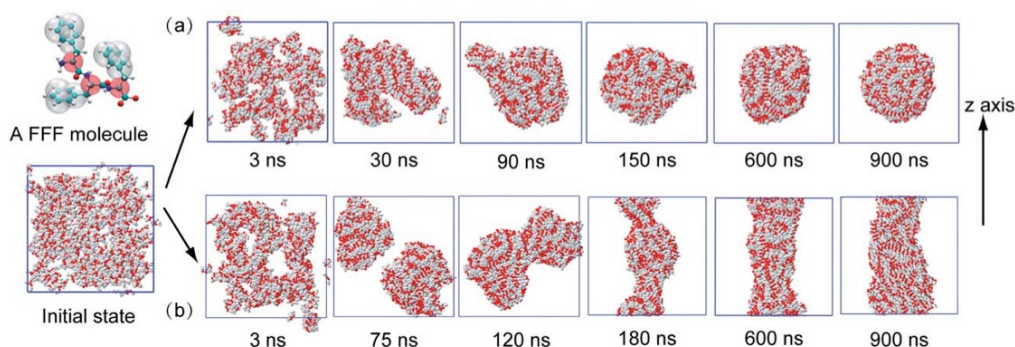


Figura 9. Trayectorias ejemplares de 600 péptidos de FFF (120 mg/mL) que dan lugar a la formación de nanoesferas (a) o nanocilindros (b), partiendo del estado desordenado. Las partes centrales se representan en rojo y las cadenas laterales en blanco. (Arriba, izquierda) Simplificación molecular del péptido FFF utilizado. Reimpreso de la Ref. [85] con la autorización de The Royal Society of Chemistry.

Si se representa la superficie de energía libre en función de la SASA y R_g por los dos sistemas de péptidos FFF y FF se obtiene una forma angular (Figura 10). Esto indica que, en la autoorganización de los péptidos, en primer lugar, la SASA se ve reducida, reflejando las fuertes interacciones hidrofóbicas y de apilamiento aromático; seguido de un lento proceso de reordenación de los péptidos, especialmente para FFF. Con FFF se obtienen dos mínimos correspondientes a las dos nanoestructuras, pero el proceso de autoorganización no involucra la formación de intermedios en bicapa (como en el caso de la FF). Las cadenas principales de FFF favorecen un alineamiento en orientación antiparalela, pudiendo formar grandes estructuras de láminas β (hasta de 13 cadenas), ya que proporcionan más contactos de cadena lateral e interacciones electrostáticas más fuertes entre péptidos que FF. Hay que decir que la orientación antiparalela está estabilizada por la atracción electrostática entre los extremos cargados N- y C-terminales.

Contrariamente a FFF, el sistema con péptidos de FF presenta un comportamiento de tipo lípido y se autoorganiza en nanovesículas y nanotubos que retienen el agua. Las láminas β aparecen uniformemente distribuidas en las nanoestructuras de FF. Además, éstas son más pequeñas y su población disminuye rápidamente con el tamaño de la hoja β , siendo un número típico 2-3 cadenas. Los autores observan que, a menor concentración de FFF (45 mg/mL), se forman nanoesferas, mientras que los nanocilindros sólo existen durante 2 μ s, convirtiéndose en una estructura esférica a los 3500 ns. A alta concentración (120 mg/mL), se observa que se acelera la formación de los nanocilindros, pero se mantiene el mecanismo. El análisis de energía potencial de las interacciones de cadena central-cadena central (CC-CC) y cadena lateral-cadena lateral (LC-LC), así como el análisis del número de contacto, revelan que la autoorganización de FF y FFF es debida a interacciones de apilamiento aromático LC-LC, y que la estructura final de FF y

de FFF es el resultado de la competición entre interacciones de CC-CC polares i LC-LC aromáticas.^[85]

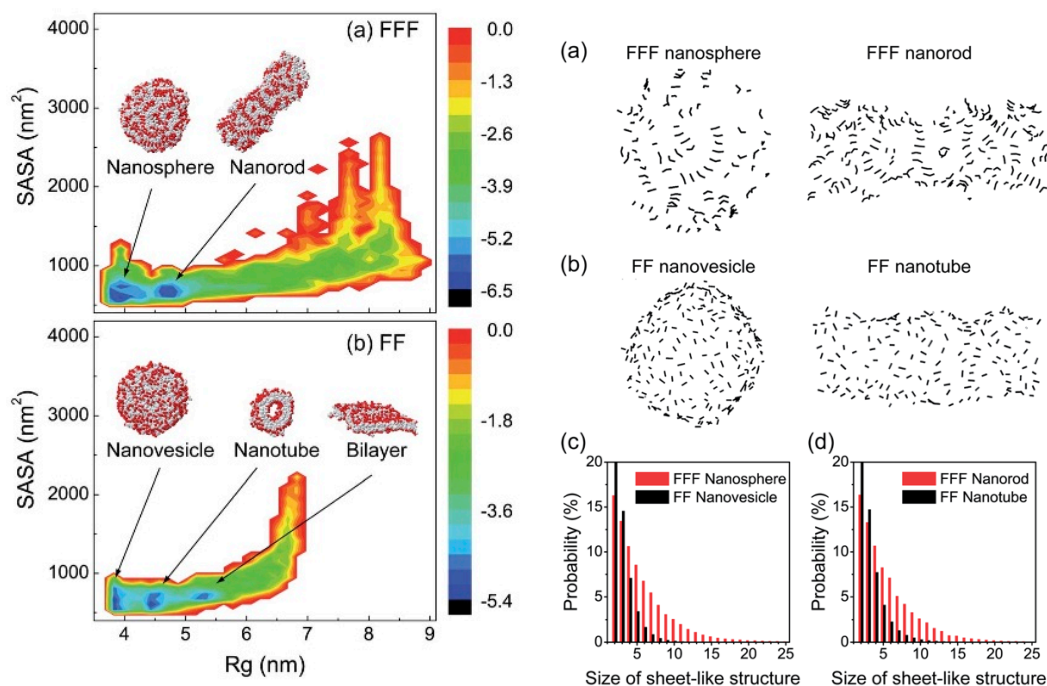


Figura 10. (Izquierda) Representación del horizonte de energía libre (kcal/mol) de (a) FFF y (b) FF proyectado sobre el R_g y SASA. Representación de las conformaciones de mínima energía dentro los gráficos. (Derecha) Nanoestructuras representativas de (a) FFF y (b) FF, y su respectiva distribución de probabilidad de lámina β en función del tamaño de la hoja. Por claridad se han omitido las cadenas laterales y las moléculas de agua. Adaptado y reimpresso de la Ref. [85] con la autorización de The Royal Society of Chemistry.

En un estudio más reciente, Guo y colaboradores, utilizando esta misma metodología teórica, obtienen nanoestructuras toroidales por el coempaquetamiento de FF y FFF (fracción de FFF 0.17-0.33), en soluciones acuosas al 4 % en HFIP a una concentración total 4 mg/mL.^[86]

El derivado Fmoc-FFF

El tripéptido protegido Fmoc-FFF también ha sido estudiado, pero esta vez, la primera aproximación a la estructura y a la autoorganización es en forma de método enzimático para la obtención de los geles.^[87] En general, se esperaría que el equilibrio se desplazase hacia bajas concentraciones de Fmoc-FFF ($K_{eq,1} < 1$) al mezclar la termolisina de *Thermoproteolyticus rokko*, Fmoc-FF y L-Phe en un medio acuoso. No obstante, la autoorganización ejerce de fuerza conductora al formar el hidrogel del tripéptido, provocando el desplazamiento del equilibrio hacia la hidrólisis inversa ($K_{eq,2} > K_{eq,1}$). El tripéptido resultante es producido con un 55 % de eficiencia y forma fibrillas de unos 10–20 nm de diámetro (12 mM) que dan lugar a un hidrogel autosoportado transparente, por primera vez, en condiciones fisiológicas (pH 7).^[88]

Extendiendo esta metodología, Ulijn y colaboradores exploran las arquitecturas funcionales de series de homooligopéptidos (glicina, leucina, fenilalanina, treonina) con el grupo Fmoc a través de las reacciones enzimáticas reversibles gobernadas por la propia autoorganización. Partiendo de los aminoácidos protegidos y los dipéptidos (o metilésteres), se hacen reaccionar con termolisina para obtener hidrogeles compuestos de material ordenado en agregados-*J* y soportados por láminas β antiparalelas. Este sistema combina tres características principales: i) se muestra reversible termodinámicamente, permitiendo la corrección estructural de defectos; ii) quimioselectividad y amplificación de las estructuras más estables en librerías combinatorias dinámicas; iii) el confinamiento espaciotemporal en la nucleación y el crecimiento.

Así, la autoorganización asistida por enzimas garantiza un control extra, especialmente en las primeras etapas, en la fabricación *bottom-up* de nanomateriales, con los cuales se pueden crear nuevas estructuras funcionales complejas. La reversibilidad y selectividad de las reacciones enzimáticas permitirá la autoorganización directa de péptidos a través del horizonte de energía libre y el descubrimiento de nuevas estructuras nanoconfinadas, que son la clave en la formación de estructuras dinámicas en los sistemas biológicos.^[89]

Esta misma metodología se aplica para obtener hidrogeles de Fmoc-FFF (1.36 mg/mL) usando dos tipos de lipasas, más económicas que la termolisina y que permiten la incorporación tridimensional de células y medio a través de la matriz no citotóxica.^[90]

No es hasta 2014 cuando se estudian las propiedades de agregación del compuesto Fmoc-FFF puro, juntamente con el tripéptido homoquiral Fmoc-*D*-FFF (Fmoc-F*F*F*) y los heteroquirales DLL y LDD (Fmoc-F*FF y Fmoc-FF*F* respectivamente). Ya que las formas enantioméricas *D* son menos propensas a la degradación enzimática, se estudian estos péptidos para mejorar su estabilidad *in vivo*. Su morfología es relevante ya que estos cuatro tripéptidos presentan un entramado de nanofibras de 7-10 nm de grosor (altura AFM) con una estructura supramolecular en hélice (Figura 11). Fmoc-FFF y FF*F* presentan una hélice dextrógira y los otros dos levógira. Fmoc-FFF es el que presenta un paso de rosca más pequeño (17 nm), mientras que F*F*F*, el más grande (40 nm); los otros dos presentan un paso de rosca entre 23-28 nm. Estos péptidos se deberían empaquetar en una estructura tipo lámina β . Los autores no utilizan FTIR para estudiar estos péptidos, pero sí el CD, concluyendo que el espectro contiene características tanto de lámina β como de hélice α . La molécula tiene dos tipos de grupos aromáticos, lo que aumenta la complejidad del espectro. Una peculiaridad es que en el espectro de los péptidos DLL y LDD hay un pico inusualmente intenso a 260 nm, que es síntoma de una fuerte agregación. Además, el efecto de la dilución en la absorbancia es despreciable, confirmando la presencia de agregados en solución. Finalmente, el hidrogel más rígido es el homoquiral Fmoc-F*F*F*, lo que permite concluir que la quiralidad juega un papel importante en la formación de una determinada estructura y modula las propiedades fisicoquímicas de los geles.^[91]

Este mismo año se estudia el comportamiento fásico de una serie de péptidos, Fmoc-FF y Fmoc-FFF entre ellos. Se observan emulsiones estables de agua-en-CHCl₃ al añadir Fmoc-FFF y emulsiones CHCl₃-en-agua estabilizadas per Fmoc-FF (Figura 12).^[92]

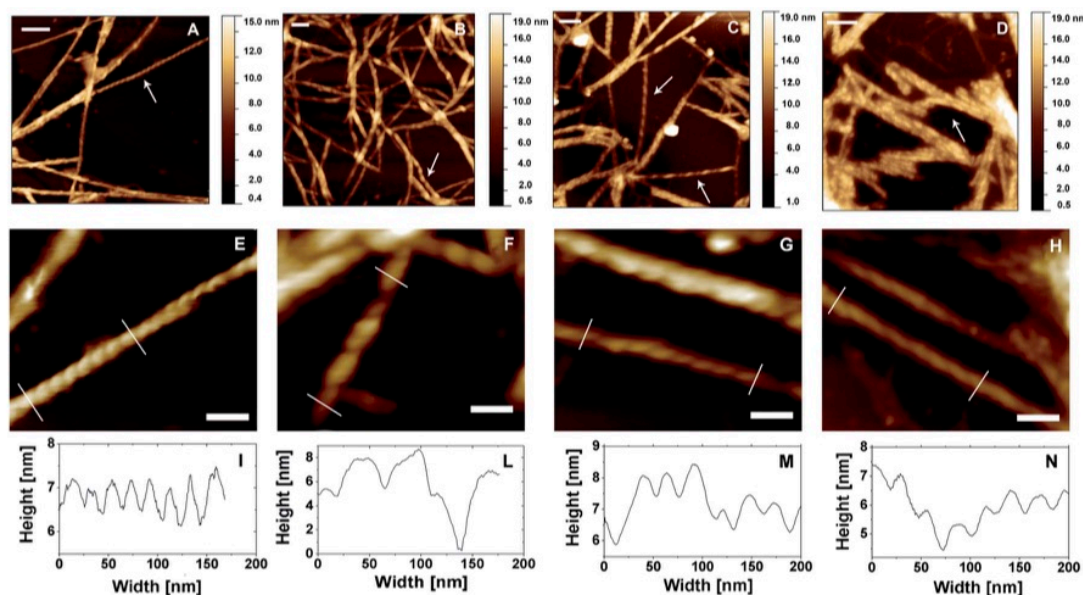


Figura 11. (A–D) Imágenes de altura de AFM de muestras de (A) Fmoc-FFF, (B) Fmoc-F*F*F*, (C) Fmoc-FF*F* y (D) Fmoc-F*F. Las flechas indican fibras donde la torsión es claramente visible. Barras de escala ¼ 100 nm. (E–H) Imágenes de altura de AFM de nanofibras torcidas de (E y I) Fmoc-FFF, (F y L) Fmoc-F*F*F*, (G y M) Fmoc-FF*F*, y (H y N) Fmoc-F*FF. Las líneas perpendiculares a la fibra marcan el segmento donde se determina la sección longitudinal en los paneles inferiores correspondientes. Barres ¼ 50 nm. Reimpreso de la Ref. [91] con la autorización de The Royal Society of Chemistry

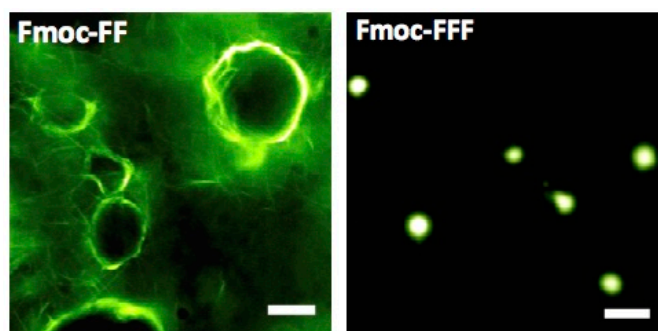


Figura 12. Gotas de emulsión estabilizadas por Fmoc-FF y Fmoc-FFF conteniendo el cromóforo FITC en la fase acuosa. Las barras de escala son 50 µm. Adaptado y reimpreso de la Ref. [92] con la autorización de la American Chemical Society

La tetrafenilalanina y homooligofenilalaninas monodispersas

El tetrapéptido FFFF desprotegido nunca ha sido estudiado con anterioridad a esta tesis, aunque series de homooligofenilalaninas monodispersas de estructura ^tBoc-Phe_n-OMe (n=2-7) han sido ampliamente estudiadas por C. Toniolo y colaboradores, y sus estudios ya han sido revisados.^[81]

El tetrapéptido ^tBoc-FFFF-OMe y los oligómeros superiores en fase sólida presentan una banda de absorción en IR a 1644 (superiores 1641) cm⁻¹, y una espalda a 1690 cm⁻¹, que es un poco superior a la esperada por una lámina β. No se trata de una hélice α ya que los heptámeros tienen una longitud de cadena inferior a la de una hélice en estado sólido. Hace falta mencionar el efecto del peso molecular en la conformación. Así como los oligómeros de L-Leu, L-Phe presentan láminas β, sus homopolímeros existen como hélices α dextrógiras tanto en el estado sólido como en algunos solventes.

El hombro a 1690 cm⁻¹ denota la orientación antiparalela de las cadenas. No obstante, ya que el grupo ^tBoc puede absorber a 1690 cm⁻¹, registraron el espectro de HCl·H-Phe₇-OMe, mostrando una sola banda a 1639 cm⁻¹. Los autores concluyen que la estructura secundaria de este último se trata de un empaquetamiento inusual de láminas β paralelas, atribuyendo este efecto a la presencia del catión amonio. Para el caso de los oligopéptidos protegidos (^tBoc-Phe₅-OMe), concluyen, a partir del UV-DC de films de péptido, que presentan una estructura β paralela posiblemente favorecida por interacciones de cadena lateral. El punto de cruzamiento para el heptámero es similar al heptámero de valina, 193 nm. Pero si, por el contrario, fuera una estructura antiparalela, el punto de cruzamiento sería en 178 nm, como en el caso del heptámero de alanina. Los péptidos estudiados (Phe, Leu, Cha) presentan una gran propensión a formar agregados ricos en estructura β en etilenglicol y soluciones acuosas, pudiendo ser destruidos por la adición de TFE o HFIP.

1.3.4. Polímeros sintéticos conjugados de oligofenilalanina

Los oligopéptidos de fenilalanina (sólo FFFF) también han sido funcionalizados con un fragmento de polímero sintético e, igualmente, han sido descritos como materiales autoorganizados e inteligentes. En esta línea, los resultados de Castelletto y Hamley, por un lado, y Tzokova y colaboradores, por el otro, presentan diferentes conjugados de tetrafenilalanina enlazada a un fragmento de PEG (diferentes pesos) que muestran un gran abanico de formas de autoorganización y de propiedades. Como muestran los resultados de los primeros,^[93] las dos partes moleculares, el segmento peptídico de FFFF y el bloque de copolímero de PEG₁₀₀, tienden a organizarse en dominios independientes, tal y como se puede explicar a nivel microscópico por simulaciones en MD atómicas.^[94] A altas concentraciones en solución se observan láminas β antiparalelas bien desarrolladas y el PEG se puede cristalizar sin irrumpir en la lámina β local que define el segmento peptídico durante el proceso de secado.

Paralelamente, en las investigaciones de Tzokova y colaboradores, utilizan *click-chemistry* para preparar conjugados de FFFF-OEt con cadenas de 7, 26 y 39 unidades de PEO. La longitud del fragmento de polímero juega un papel crucial en las propiedades de autoorganización.^[95] Para los bloques más cortos (PEO₇-FFFF-OEt), se forman nanotubos en una estructura de lámina β

antiparalela envuelta de cadenas de PEO, o bien hidrogeles blandos en altas concentraciones.^[96] Al incrementar la longitud del copolímero hidrofílico se da lugar a fibras y, por último, micelas en forma de gusano, en las que el apilamiento π - π prevalece sobre la formación de láminas β . En vista del éxito de estos materiales nanoestructurados, el grupo IMEM ha simulado las características de agregación del conjugado H-FFFF-PEG₁₀₀.^[94] En este trabajo se realiza una dinámica molecular de 20 ns a un nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) que muestra el desplazamiento del segmento polimérico desde la forma de ovillo estadístico y se trazan los mapas de Ramachandran para la rotación de los enlaces de los residuos centrales de fenilalanina (Phe 2 y 3) en el bloc de FFFF.

Finalmente, recordar que en trabajos precedentes en el grupo PSEP se han considerado y revisado las técnicas de síntesis de conjugados péptido-polímero sintético y los empaquetamientos supramoleculares que pueden adoptar, lo cuales se encuentran mayoritariamente determinados por el fragmento peptídico.^[97] El grupo también ha publicado un estudio donde se muestran las propiedades estructurales de conjugados péptido-poliláctida, en este caso: fenilalanina-PLA (F-PLA) y difenilalanina-PLA (FF-PLA). En este trabajo, el fragmento peptídico del nuevo material basado en FF-PLA retiene las preferencias conformacionales nativas del dipéptido FF que son necesarias para promover la formación de nanoestructuras a partir de la autoagregación.^[98] Recientemente, se ha publicado la síntesis y las características físicas del copolímero de PLA y polifenilalanina (PPhe), donde se apunta que el material se separa en fases cristalinas de PLA y PPhe, tal y como se muestra usando técnicas de DSC, UV-Vis, rayos-X en polvo y microscopía óptica de polarización.^[99]

1.4. Referencias

- [1] M. Reches, E. Gazit, *Science* **2003**, *300*, 625–627.
- [2] H. Cölfen, S. Mann, *Angew. Chemie, Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 2350–2365.
- [3] S. Zhang, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1171–1178.
- [4] R. J. Mart, R. D. Osborne, M. M. Stevens, R. V. Ulijn, *Soft Matter* **2006**, *2*, 822–835.
- [5] P. Sharma, B. Rath, J. Rodrigues, N. Gorobets, *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *15*, 1268–1289.
- [6] H. Hosseinkhani, P.-D. Hong, D.-S. Yu, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4837–4861.
- [7] Q. Wang, X. Zhang, J. Zheng, D. Liu, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 25461–25469.
- [8] K. Rajagopal, J. P. Schneider, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 480–486.
- [9] E. Gazit, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1263–1269.
- [10] S. Fleming, R. V. Ulijn, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 8150–8177.
- [11] B. A. Mitraki, K. Papanikolopoulou, M. J. V. A. N. Raaij, *Adv. Protein Chem.* **2006**, *73*, 97–124.
- [12] T. O. Mason, D. Y. Chirgadze, A. Levin, L. Adler-Abramovich, E. Gazit, T. P. J. Knowles, A. K. Buell, *ACS Nano* **2014**, *8*, 1243–1253.
- [13] M. R. Ghadiri, J. R. Granja, L. K. Buehler, *Nature* **1994**, *369*, 301–304.

-
- [14] L. Echegoyen, *Nature* **1994**, 369, 276–277.
- [15] A. B. Seabra, N. Durán, *Peptides* **2013**, 39, 47–54.
- [16] S. Marchesan, A. V. Vargiu, K. E. Styan, *Molecules* **2015**, 19775–19788.
- [17] X. Yan, P. Zhu, J. Li, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1877–1890.
- [18] R. Silva, D. Araujo, E. Silva, R. Ando, W. Alves, *Langmuir* **2013**, 29, 10205–10212.
- [19] V. L. Sedman, L. Adler-Abramovich, S. Allen, E. Gazit, S. J. B. Tendler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6903–6908.
- [20] R. Huang, W. Qi, L. Feng, R. Su, Z. He, *Soft Matter* **2011**, 7, 6222–6230.
- [21] T. Liebmann, S. Rydholm, V. Akpe, H. Brismar, *BMC Biotechnol.* **2007**, 7, 88.
- [22] V. Jayawarna, M. Ali, T. A. Jowitt, A. F. Miller, A. Saiani, J. E. Gough, R. V. Ulijn, *Adv. Mater.* **2006**, 18, 611–614.
- [23] V. Jayawarna, S. M. Richardson, A. R. Hirst, N. W. Hodson, A. Saiani, J. E. Gough, R. V. Ulijn, *Acta Biomater.* **2009**, 5, 934–943.
- [24] J. B. Matson, S. I. Stupp, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 26–33.
- [25] G. G. Scott, P. J. McKnight, T. Tuttle, R. V. Ulijn, *Adv. Mater.* **2016**, 28, 1381–1386.
- [26] C. Diaferia, E. Gianolio, P. Palladino, F. Arena, C. Boffa, G. Morelli, A. Accardo, *Adv. Funct. Mater.* **2015**, 25, 7003–7016.
- [27] M. Reches, E. Gazit, *Phys. Biol.* **2006**, 3, S10–S19.
- [28] G. Rosenman, P. Beker, I. Koren, M. Yevnin, B. Bank-Srour, E. Mishina, S. Semin, *J. Pept. Sci.* **2011**, 17, 75–87.
- [29] A. Lakshmanan, S. Zhang, C. A. Hauser, *Trends Biotechnol.* **2012**, 30, 155–165.
- [30] M. Yemini, M. Reches, J. Rishpon, E. Gazit, *Nano Lett.* **2005**, 5, 183–186.
- [31] T. C. Cipriano, P. M. Takahashi, D. de Lima, V. X. Oliveira, J. A. Souza, H. Martinho, W. A. Alves, *J. Mater. Sci.* **2010**, 45, 5101–5108.
- [32] T. Cipriano, G. Knotts, A. Laudari, R. C. Bianchi, W. A. Alves, S. Guha, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 21408–21415.
- [33] L. Adler-Abramovich, M. Badihi-Mossberg, E. Gazit, J. Rishpon, *Small* **2010**, 6, 825–831.
- [34] J. H. Kim, J. Ryu, C. B. Park, *Small* **2011**, 7, 718–722.
- [35] J. Ryu, S.-W. Kim, K. Kang, C. B. Park, *Adv. Mat.* **2010**, 22, 5537–5541.
- [36] P. Beker, I. Koren, N. Amdursky, E. Gazit, G. Rosenman, *J. Mater. Sci.* **2010**, 45, 6374–6378.
- [37] J. Ryu, S.-W. Kim, K. Kang, C. B. Park, *ACS Nano* **2010**, 4, 159–164.
- [38] A. Kholkin, N. Amdursky, I. Bdikin, E. Gazit, G. Rosenman, *ACS Nano* **2010**, 4, 610–614.
- [39] N. Amdursky, P. Beker, J. Schklovsky, E. Gazit, G. Rosenman, *Ferroelectrics* **2010**, 399, 107–117.
- [40] I. Bdikin, V. Bystrov, S. Kopyl, R. P. G. Lopes, I. Delgadillo, J. Gracio, E. Mishina, A. Sigov, A. L. Kholkin, *Appl. Phys. Lett.* **2012**, 100, 43702.
- [41] Z. Gan, X. Wu, X. Zhu, J. Shen, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 2109–2113.
- [42] C. Chen, K. Liu, J. Li, X. Yan, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, 225, 177–193.
- [43] J. S. Lee, I. Yoon, J. Kim, H. Ihee, B. Kim, C. B. Park, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2011**, 50, 1164–1167.

-
- [44] A. Handelman, N. Kuritz, A. Natan, G. Rosenman, *Langmuir* **2016**, *32*, 2847–2862.
- [45] S. Semin, A. van Etteger, L. Cattaneo, N. Amdursky, L. Kulyuk, S. Lavrov, A. Sigov, E. Mishina, G. Rosenman, T. Rasing, *Small* **2015**, *11*, 1156–1160.
- [46] Y. Liang, P. Guo, S. V. Pingali, S. Pabit, P. Thiyagarajan, K. M. Berland, D. G. Lynn, *Chem. Commun.* **2008**, 6522–6524.
- [47] H. Acar, R. Garifullin, L. E. Aygun, A. K. Okyay, M. O. Guler, *J. Mater. Chem. A* **2013**, *1*, 10979–10984.
- [48] T. H. Han, H.-S. Moon, J. O. Hwang, S. Il Seok, S. H. Im, S. O. Kim, *Nanotechnology* **2010**, *21*, 185601–185607.
- [49] J. H. Kim, M. Lee, J. S. Lee, C. B. Park, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 517–520.
- [50] X. Yan, J. Li, H. Möhwald, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 2796–2801.
- [51] Q. Li, Y. Jia, L. Dai, Y. Yang, J. Li, *ACS Nano* **2015**, *9*, 2689–2695.
- [52] A. Handelman, A. Natan, G. Rosenman, *J. Pept. Sci.* **2014**, *20*, 487–493.
- [53] X. Yan, Y. Cui, Q. He, K. Wang, J. Li, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 1522–1526.
- [54] L. Adler-abramovich, E. Gazit, *J. Pept. Sci.* **2008**, 217–223.
- [55] J. Castillo-León, R. Rodriguez-Trujillo, S. Gauthier, A. C. Ø. Jensen, W. E. Svendsen, *Microelectron. Eng.* **2011**, *88*, 1685–1688.
- [56] M. A. Khalily, O. Ustahuseyin, R. Garifullin, R. Genc, M. O. Guler, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11358–11360.
- [57] S. Cavalli, F. Albericio, A. Kros, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 241–263.
- [58] D. J. Adams, P. D. Topham, *Soft Matter* **2010**, *6*, 3707–3721.
- [59] C. H. Görbitz, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 5153–5159.
- [60] C. H. Görbitz, *Chem. Commun.* **2006**, 2332–2334.
- [61] C. H. Görbitz, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 1022–1031.
- [62] M. Wang, L. Du, X. Wu, S. Xiong, P. K. Chu, *ACS Nano* **2011**, *5*, 4448–4454.
- [63] V. Madison, K. D. Kopple, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 420–427.
- [64] C. A. . E. . Hauser, S. Zhang, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *468*, 516–517.
- [65] P. Zhu, X. Yan, Y. Su, Y. Yang, J. Li, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 3176–3183.
- [66] R. Huang, Y. Wang, W. Qi, R. Su, Z. He, *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, *9*, 653.
- [67] J. Wang, K. Liu, L. Yan, A. Wang, S. Bai, X. Yan, *ACS Nano* **2016**, *10*, 2138–2143.
- [68] J. Kim, T. H. Han, Y.-I. Kim, J. S. Park, J. Choi, D. G. Churchill, S. O. Kim, H. Ihee, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 583–587.
- [69] P. Kumaraswamy, R. Lakshmanan, S. Sethuraman, U. M. Krishnan, *Soft Matter* **2017**, *13*, 886–886.
- [70] R. Huang, W. Qi, R. Su, J. Zhao, Z. He, *Soft Matter* **2011**, *7*, 6418–6421.
- [71] M. Hashemi, P. Fojan, L. Gurevich, *J. Self-Assembly Mol. Electron.* **2013**, *1*, 195–208.
- [72] C. Guo, Y. Luo, R. Zhou, G. Wei, *ACS Nano* **2012**, *6*, 3907–3918.
- [73] A. Mahler, M. Rechtes, M. Rechter, S. Cohen, E. Gazit, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1365–1370.
- [74] A. M. Smith, R. J. Williams, C. Tang, P. Coppo, R. F. Collins, M. L. Turner, A. Saiani, R. V. Uljin, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 37–41.

-
- [75] C. Tang, A. M. Smith, R. F. Collins, R. V. Ulijn, A. Saiani, *Langmuir* **2009**, *25*, 9447–9453.
- [76] G. Fichman, E. Gazit, *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 1671–1682.
- [77] J. Raeburn, G. Pont, L. Chen, Y. Cesbron, R. Lévy, D. J. Adams, *Soft Matter* **2012**, *8*, 1168–1174.
- [78] J. Raeburn, A. Zamith Cardoso, D. J. Adams, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5143–5156.
- [79] J. Raeburn, C. Mendoza-Cuenca, B. N. Cattoz, M. A. Little, A. E. Terry, A. Zamith Cardoso, P. C. Griffiths, D. J. Adams, *Soft Matter* **2015**, *11*, 927–935.
- [80] N. A. Dudukovic, C. F. Zukoski, *Soft Matter* **2014**, *10*, 7849–7856.
- [81] Masahito Oka, Yoshihiro Baba, Akihiro Kagemoto, Akio Nakajima, *Polym. J.* **1989**, *21*, 1011–1017.
- [82] P. Tamamis, L. Adler-Abramovich, E. Gazit, G. Archontis, in *From Computational Biophysics to Systems Biology 2008 (CBSB08)* (Eds.: U. H. E. Hansmann, J. H. Meinke, S. Mohanty, W. Nadler, O. Zimmermann), John von Neumann Institute for Computing (Jülich), NIC Series, Vol. 40, pp. 393–396.
- [83] P. Tamamis, L. Adler-Abramovich, M. Reches, K. Marshall, P. Sikorski, L. Serpell, E. Gazit, G. Archontis, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 5020–5029.
- [84] E. Gloaguen, Y. Loquais, J. A. Thomas, D. W. Pratt, M. Mons, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 4945–4955.
- [85] C. Guo, Y. Luo, R. Zhou, G. Wei, *Nanoscale* **2014**, *6*, 2800–2811.
- [86] C. Guo, Z. A. Arnon, R. Qi, Q. Zhang, L. Adler-Abramovich, E. Gazit, G. Wei, *ACS Nano* **2016**, *10*, 8316–8324.
- [87] S. Toledano, R. J. Williams, V. Jayawarna, R. V. Ulijn, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1070–1071.
- [88] D. M. Ryan, B. L. Nilsson, *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 18–33.
- [89] R. J. Williams, A. M. Smith, R. Collins, N. Hodson, A. K. Das, R. V. Ulijn, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 19–24.
- [90] L. Chronopoulou, S. Lorenzoni, G. Masci, M. Dentini, A. R. Togna, G. Togna, F. Bordini, C. Palocci, *Soft Matter* **2010**, *6*, 2525–2532.
- [91] L. Chronopoulou, S. Sennato, F. Bordini, D. Giannella, A. Di Nitto, A. Barbeta, M. Dentini, R. Togna, G. I. Togna, C. Palocci, *Soft Matter* **2014**, *10*, 1944–1952.
- [92] S. Bai, C. Pappas, S. Debnath, P. W. J. M. Frederix, J. Leckie, S. Fleming, R. V. Ulijn, *ACS Nano* **2014**, *8*, 7005–7013.
- [93] V. Castelletto, I. W. Hamley, *Biophys. Chem.* **2009**, *141*, 169–174.
- [94] D. Zanuy, I. Hamley, C. Alemán, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 8937–8946.
- [95] N. Tzokova, C. M. Fernyhough, M. F. Butler, S. P. Armes, A. J. Ryan, P. D. Topham, D. J. Adams, *Langmuir* **2009**, *25*, 11082–11089.
- [96] N. Tzokova, C. M. Fernyhough, P. D. Topham, N. Sardon, D. J. Adams, M. F. Butler, S. P. Armes, A. J. Ryan, *Langmuir* **2009**, *25*, 2479–2485.
- [97] M. Morell, J. Puiggalí, *Polymers (Basel)*. **2013**, *5*, 188–224.
- [98] S. K. Murase, N. Haspel, L. J. del Valle, E. A. Perpète, C. Michaux, R. Nussinov, J. Puiggalí, C. Alemán, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 23231–23241.
- [99] M. Planellas, J. Puiggalí, *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 13247–13266.

